

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE-CUENCA.**

CARRERA DE INGENIERÍA AMBIENTAL.

**Tesis previa a la obtención del título de
Ingeniero Ambiental.**

TÍTULO:

**“Evaluación de la toxicidad del suelo durante y después de un
proceso de biorremediación de hidrocarburos aromáticos
policíclicos HAPs”.**

AUTORES:

**Pablo Ismael Fernández de Córdova Márquez.
Jorge Felipe Humbser Lucero.**

DIRECTOR:

Lic. Manuel Ernesto Delgado Fernández MSc.

Cuenca, Marzo del 2014

AGRADECIMIENTOS.

Quiero agradecer a todas y cada una de las personas que de una u otra forma ayudaron en la realización de esta Tesis.

Principalmente a Pablo, Diana, Camila y a mi familia, tanto por el apoyo que siempre he recibido, por su aliento, su cariño y por ser parte de mi vida.

A mi Director de Tesis, Dr. Ernesto Delgado Fernández, PhD. quien nos brindó el soporte académico, científico para llevar adelante esta investigación, con un tema que es de mucho interés e importancia y que está orientado hacia nuestras preferencias estudiantiles.

Gracias Suco, esta Tesis es el resultado de nuestro esfuerzo.

Payuk, QyK, Alfri, Sebas, Shuco, Mono, Bruno, Mono N, Igor, Topo, Yorgui, Alvari, Pricy Suca, Chuplin, Pao, Churos. Muchas gracias, sin ustedes no hubiese sido lo mismo todo lo vivido.

Gracias a todos con quienes he compartido en algún momento la vida estudiantil.

Ismael Fernández de Córdova Márquez.

Quiero agradecer a todas las personas que formaron parte de una u otra manera de esta meta cumplida:

A mi familia, que sin su apoyo esto no hubiera sido posible, a mi Mamá que siempre ha estado ahí para apoyarme y compartir los buenos y malos momentos.

A nuestro Director, Dr. Ernesto Delgado Fernández, PhD. por el soporte académico y guía, durante el proceso y culminación de esta tesis.

A mi compañero y amigo de tesis Isma, por su apoyo en todo este proyecto.

A mi novia Andrew, que en todo momento estuvo a mi lado brindándome su compañía y apoyo, y a todos mis amigos que siempre han estado ahí, sin los cuales nada hubiera sido lo mismo.

Felipe Humbser Lucero.

DECLARATORIA DE RESPONSABILIDAD.

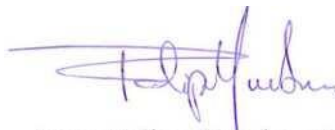
Los conceptos desarrollados, análisis realizados y las conclusiones del presente trabajo son de exclusiva responsabilidad de los autores Pablo Ismael Fernández de Córdova Márquez y Jorge Felipe Humbser Lucero. Autorizamos a la Universidad Politécnica Salesiana el uso de la misma con fines académicos.

A través de la presente declaración cedemos los derechos de propiedad intelectual correspondiente a este trabajo a la Universidad Politécnica Salesiana, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su reglamento y por la normativa institucional vigente.

Cuenca, Marzo de 2014.



Ismael Fernández de Córdova Márquez.



Jorge Felipe Humbser Lucero.

CERTIFICACIÓN.

Certifico que el presente trabajo fue desarrollado por los estudiantes Ismael Fernández de Córdova Márquez y Felipe Humbser, bajo mi supervisión.



Ernesto Delgado Fernández, PhD.

RESUMEN.

El presente trabajo de investigación titulado “**Evaluación de la toxicidad del suelo durante y después de un proceso de biorremediación de hidrocarburos aromáticos policíclicos HAPs**”, se desarrolló con la finalidad de hacer la valoración de un suelo luego de un proceso de biorremediación de hidrocarburos aromáticos policíclicos HAPs, la valoración se centra en la actividad enzimática de la Ureasa y la Catalasa, además de bioensayos utilizando semillas de trigo (*Triticum aestivum*), lechuga (*Lactuca sativa*) y maíz (*Zea mays*) se considera en este caso la capacidad de germinación de las semillas en mención.

En base al análisis estadístico de los resultados obtenidos en el bioensayo con semillas, se demuestra que los tratamientos (Consortios microbianos formados por hongos del género *Trichoderma* sp.) fueron eficaces en la biodegradación de HAPs a campo abierto.

Los factores que se consideraron en la valoración son (radícula, hipocotilo y biomasa) igualmente estadísticamente se establece que la concentración de HAPs presente en el suelo no afecta el desarrollo de las semillas. Excepto en el análisis de la longitud del hipocotilo en semillas de trigo y lechuga *Lactuca sativa* L. A pesar de que el sistema radicular se presenta en las semillas este no se puede completar exitosamente.

La germinación de las semillas de trigo *Triticum aestivum*, lechuga *Lactuca sativa*, y maíz *Zea mayz* presentan un desarrollo normal.

El análisis estadístico de los resultados de la actividad enzimática demuestra la eficacia de los tratamientos empleados en la biorremediación de HAPs, en este estudio no se pudo establecer una relación entre la germinación de las semillas y la actividad enzimática del suelo.

INDICE DE CONTENIDOS.

ÍNDICE DE TABLAS.	13
INTRODUCCIÓN.	15
JUSTIFICACIÓN.	17
OBJETIVOS.	18
OBJETIVO GENERAL.	18
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	18
HIPOTESIS.	19
CAPÍTULO I:	20
MARCO TEÓRICO.	20
1. EL SUELO.	20
1.1. PERFIL DEL SUELO.	21
1.1.1. Horizonte A.	21
1.1.2. Horizonte B.	22
1.1.3. Horizonte C.	22
1.1.4. Roca madre D.	22
1.2. COMPOSICIÓN.	23
1.2.1. Fase sólida.	24
1.2.2. Fase Líquida.	26
1.2.3. Fase Gaseosa.	27
1.3. COMPONENTES INORGÁNICOS DEL SUELO.	28
1.3.1. Fracciones no coloidales.	29
1.3.2. Fracciones coloidales.	29
1.4. FORMACIÓN.	30
1.4.1. La materia orgánica en la formación del suelo.	31

1.4.2.	Las rocas como factor formador del suelo.....	33
1.5.	EL CLIMA Y LA FORMACIÓN DEL SUELO.	35
1.6.	PROPIEDADES DEL SUELO.	35
1.7.	ESTRUCTURA DEL SUELO.	36
1.8.	TEXTURA DEL SUELO.....	37
1.8.1.	Textura arcillosa.....	37
1.8.2.	Textura arenosa.	37
1.8.3.	Textura franca.	38
1.8.4.	Textura franco-arcillosa.	38
1.8.5.	Textura franco-arenosa.....	38
1.9.	COLOR DEL SUELO.....	39
1.10.	PERMEABILIDAD.....	40
1.11.	POROSIDAD.....	41
1.12.	DRENAJE.....	41
1.13.	CONSISTENCIA.....	42
1.14.	PROFUNDIDAD EFECTIVA.	42
2.	TIPOS DE SUELO.	43
2.1.	ORDEN DE LOS SUELOS SEGÚN SU TAXONOMÍA.	43
2.1.1.	Alfisoles.	43
2.1.2.	Andisoles.....	44
2.1.3.	Aridisoles.	44
2.1.4.	Entisoles.....	45
2.1.5.	Gelisoles.....	45
2.1.6.	Histosoles.....	46
2.1.7.	Inceptisoles.....	46

2.1.8.	Molisoles.....	47
2.1.9.	Oxisoles.....	47
2.1.10.	Spodosoles.....	48
2.1.11.	Ultisoles.....	48
2.1.12.	Vertisoles.....	49
2.2.	CLASIFICACIÓN DE ACUERDO A DIFERENCIAS ENTRE SUELOS.....	49
2.2.1.	Litisoles.....	50
2.2.2.	Cambisoles.....	50
2.2.3.	Luvisoles.....	50
2.2.4.	Acrisoles.....	51
2.2.5.	Fluvisoles.....	51
2.2.6.	Vertisoles.....	52
2.3.	FUNCIONES DEL SUELO.....	52
2.3.1.	Funciones naturales.....	52
2.3.2.	Funciones de uso.....	53
3.	CONTAMINACIÓN DEL SUELO.....	53
3.1.	CONTAMINACIÓN POR HIDROCARBUROS.....	54
3.2.	EFFECTOS EN EL MEDIO AMBIENTE DE SUELOS CONTAMINADOS..	56
3.2.1.	Efectos de la contaminación.....	56
3.2.2.	Degradación.....	57
4.	BIORREMEDIACIÓN DE HIDROCARBUROS.....	59
4.1.	Reseña.....	59
4.1.1.	Historia.....	61
4.2.	TÉCNICAS DE BIORREMEDIACIÓN.....	62
4.2.1.	Según organismo empleado.....	63

4.3.	SEGÚN LA TÉCNICA UTILIZADA.	66
4.3.1.	Bioaumentación.....	66
4.3.2.	Bioestimulación.	66
4.3.3.	Inoculación.....	67
4.3.4.	Land farming (cultivo de la tierra).....	67
4.3.5.	Biopilas.	68
4.3.6.	Biofiltros.	69
4.4.	SEGÚN EL LUGAR DE REALIZACIÓN.....	70
4.4.1.	In situ.....	70
4.4.2.	Ex situ.	70
4.5.	BIORREMEDIACIÓN DE HAPS.....	71
4.5.1.	Estructura de los HAPs.	71
4.5.2.	Origen y distribución de los HAPs en el medio ambiente.	73
4.5.3.	Fuentes de emisión de HAPs.	74
4.5.4.	Proceso de biodegradación de HAPs.....	75
4.6.	MICROORGANISMOS DEGRADADORES DE HAPS.	76
4.6.1.	Endógenos.....	78
4.6.2.	Exógenos.....	78
4.7.	PROCESO DE DEGRADACIÓN BIOLÓGICA.	78
4.8.	APLICACIONES DE LA BIORREMEDIACIÓN.....	80
	CAPÍTULO II.....	82
	MATERIALES Y MÉTODOS.....	82
1.1.	DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA UREASA.....	83
1.1.1.	Fundamento del método.....	84
1.1.2.	Procedimiento.	84

1.1.3. Control.	85
1.1.4. Estimación del amonio desprendido.	85
1.2. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA CATALASA.....	87
1.2.1. Fundamento del método.....	88
1.2.2. Procedimiento.	88
1.2.3. Medición del peróxido de hidrógeno remanente.....	88
1.2.4. Controles.	89
1.3. EVALUACION DE LA TOXICIDAD DE LOS SUELOS MEDIANTE ENSAYOS CON SEMILLAS.	91
1.3.1. Fundamento del método.....	91
1.3.2. Procedimiento.	91
1.3.3. Primera fase, suelo.	92
1.3.4. Segunda fase, semillas.	100
1.4. BIOENSAYOS CON SEMILLAS.....	103
CAPÍTULO III.....	107
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	107
1. RESULTADOS.....	107
ANÁLISIS SEMILLA.- FACTOR DE GERMINACIÓN.	107
A. LONGITUD DE RADÍCULA EN SEMILLAS DE MAÍZ (<i>Zea mays</i>).	107
B. LONGITUD DE LA RADÍCULA EN SEMILLAS DE TRIGO (<i>Triticum aestivum</i>).	109
C. LONGITUD DE LA RADÍCULA EN SEMILLAS DE LECHUGA (<i>Lactuca sativa</i>).	112
D. LONGITUD DEL HIPOCÓTILO EN SEMILLAS DE MAÍZ.	114
E. LONGITUD HIPOCÓTILO EN SEMILLAS DE TRIGO (<i>Triticum aestivum</i>).	

F. LONGITUD DEL HIPOCÓTILO EN SEMILLAS DE LECHUGA (<i>Lactuca sativa</i>).....	117
G. BIOMASA EN SEMILLAS DE MAÍZ (<i>Zea mays</i>).	117
H. BIOMASA EN SEMILLAS DE TRIGO (<i>Triticum aestivum</i>).	119
I. BIOMASA EN SEMILLAS DE LECHUGA (<i>Lactuca sativa</i>).....	121
ANÁLISIS ENZIMÁTICO.....	124
A. UREASA.....	124
B. CATALASA.....	127
3. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	132
ANÁLISIS SEMILLA.- FACTOR DE GERMINACIÓN.	132
LONGITUD DE LA RADÍCULA EN SEMILLAS DE MAÍZ <i>Zea mays</i>	132
LONGITUD DE LA RADÍCULA EN SEMILLAS DE TRIGO <i>Triticum aestivum</i>	132
LONGITUD DE LA RADÍCULA EN SEMILLAS DE LECHUGA <i>Lactuca Sativa</i> L.	132
LONGITUD DEL HIPOCÓTILO EN SEMILLAS DE MAÍZ <i>Zea mays</i>	133
LONGITUD HIPOCÓTILO EN SEMILLAS DE TRIGO <i>Triticum aestivum</i>	133
LONGITUD DEL HIPOCÓTILO EN SEMILLAS DE LECHUGA <i>Lactuca sativa</i> L.	133
BIOMASA EN SEMILLAS DE MAÍZ <i>Zea mays</i>	133
BIOMASA EN SEMILLAS DE TRIGO <i>Triticum aestivum</i>	134
BIOMASA EN SEMILLAS DE LECHUGA <i>Lactuca sativa</i> L.	134
ANÁLISIS ENZIMÁTICO.....	134
ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.....	134
UREASA.....	134
CATALASA.	135
RECOMENDACIONES.....	137

BIBLIOGRAFÍA.	138
GLOSARIO DE TÉRMINOS.....	143
ANEXOS.	147

INDICE DE ILUSTRACIONES.

Ilustración 1. Perfiles del suelo, 2005.	23
Ilustración 2. Componentes del Suelo, 2010.	24
Ilustración 3. Distribución de los poros en el suelo, 2010.	28
Ilustración 4. Componentes químicos del suelo, 2003.	30
Ilustración 5. Formación del suelo, 2010.	31
Ilustración 6. Materia orgánica del suelo, 2003.	32
Ilustración 7. Texturas del suelo, 2010.	39
Ilustración 8. Suelo con hidrocarburos, 2011.	56
Ilustración 9. Área de Land farming - Shushufindi, 2011.	68
Ilustración 10. Biopilas – Shushufindi, 2011.	69
Ilustración 11. Biofiltros, 2006.	70
Ilustración 12. Estructura química de HAPs, 2003.	72
Ilustración 13. Destilación de las muestras incubadas, 2013.	86
Ilustración 14. Concentrado de destilación, 2013.	86
Ilustración 15. Viraje de la solución en la titulación, 2013.	87
Ilustración 16. Proceso de titulación, 2013.	89
Ilustración 17. Viraje de muestras, 2013.	89
Ilustración 18. Proceso de titulación del blanco, 2013.	90
Ilustración 19. Fases, bioensayos con semillas, 2013.	92
Ilustración 20. Cajas con suelos biorremediados, ELECAUSTRO S.A., 2013.	93
Ilustración 21. Trituración y preparación del suelo, 2013.	94
Ilustración 22. Muestra de suelo para reflujos, 2013.	95
Ilustración 23. Éter para condensación y cristales de ebullición, 2103.	96
Ilustración 24. Equipo para reflujos, 2013.	96
Ilustración 25. Disolvente condensado, 2013.	97
Ilustración 26. Disolvente con el suelo listo para el reflujo, 2013.	98
Ilustración 27. Extracto de suelo, con cristales de ebullición, 2013.	98
Ilustración 28. Rota vapor para recuperación de solvente, 2013.	99
Ilustración 29. Semillas lechuga, trigo y maíz, 2013.	100

Ilustración 30. Semillas pruebas de viabilidad, 2013.....	102
Ilustración 31. Semillas aptas para germinación, 2013.....	102
Ilustración 32. Semillas de maíz, con coloración, 2013.....	103
Ilustración 33. Semillas para la prueba de germinación, 2013.	104
Ilustración 34. Semillas junto al extracto de suelo con hidrocarburo, 2013.	104
Ilustración 35. Semillas en la cámara de germinación, 2013.....	105
Ilustración 36. Semillas germinadas en cajas Petri, 2013.	106
Ilustración 37. Conteo y evaluación de variables de desarrollo, 2013.....	106
Ilustración 38. Longitud de Radícula en semillas de Maíz, 2014.	109
Ilustración 39. Longitud de la Radícula en semillas de Trigo, 2014.....	111
Ilustración 40. Longitud de la radícula en semillas de Lechuga, 2014.....	114
Ilustración 41. Longitud del hipocótilo en semillas de Maíz, 2014.....	116
Ilustración 42. Biomasa en semillas de Maíz, 2014.....	119
Ilustración 43. Biomasa en semillas de Trigo, 2014.	121
Ilustración 44. Biomasa en semillas de Lechuga, 2014.	123
Ilustración 45. Actividad enzimática Ureasa, 2014.	126
Ilustración 46. Actividad enzimática Catalasa, 2014.....	129
Ilustración 47. Actividad enzimática Catalasa y Ureasa, 2014.....	130

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Fases del suelo, 2013.	27
Tabla 2. Componentes químicos de la materia orgánica del suelo, 2013.	33
Tabla 3. Tipos de Fitorremediación, 2010.	65
Tabla 4. Compilación, Bacterias degradadoras de HAPs, 2013.	77
Tabla 5. Compilación, Hongos degradadores de HAPs, 2013.	77
Tabla 6. Análisis químico del suelo, 2013.	94
Tabla 7. Longitud de radícula en semillas de maíz, 2014.	108
Tabla 8. Longitud de la Radícula en semillas de Trigo, 2014.	110
Tabla 9. Longitud de la radícula en semillas de Lechuga, 2014.	112
Tabla 10. Longitud del hipocótilo en semillas de Maíz, 2014.	115
Tabla 11. Biomasa en semillas de Maíz, 2014.	117
Tabla 12. Biomasa en semillas de Trigo, 2014.	120
Tabla 13. Biomasa en semillas de Lechuga, 2014.	122
Tabla 14. Actividad enzimática Ureasa, 2014.	124
Tabla 15. Actividad enzimática Catalasa, 2014.	127
Tabla 16. Resumen del RAOH, valores máximos permitidos de HAPs en el suelo, 2013.	136
Tabla 17. Tipos de suelo, 2010.	149
Tabla 18. Materiales utilizados en la práctica de la Ureasa, 2013.	150
Tabla 19. Reactivos utilizados en la práctica de la Ureasa, 2013.	150
Tabla 20. Materiales utilizados en la práctica de la Catalasa, 2013.	152
Tabla 21. Reactivos utilizados en la práctica de la Catalasa, 2013.	152
Tabla 22. Materiales Utilizados en la práctica de bioensayos con semillas, 2013.	153
Tabla 23. Reactivos utilizados en la práctica de bioensayos con semillas, 2013.	153
Tabla 24. Tratamientos utilizados en la experimentación, 2013.	156

ÍNDICE DE ECUACIONES.

Ecuación 1. Coeficiente de permeabilidad, 2009.....	147
Ecuación 2. Porosidad del suelo, 2009.....	147
Ecuación 3. Porosidad expresada en porcentaje, 2009.	148
Ecuación 4. Actividad de la ureasa, 2013.	154
Ecuación 5. Actividad de la catalasa, 2013.....	155

INTRODUCCIÓN.

La contaminación de los suelos por hidrocarburos en los diferentes ecosistemas terrestres, se ha incrementado con el pasar de los años. Debido al aumento en las actividades de exploración, producción y comercialización de hidrocarburos, acompañados de sus derivados (DÉLEY, 2010). Al ser los combustibles productos de consumo masivo, han provocado una serie de impactos negativos, generando desequilibrios medio ambientales que ahora son mucho más notorios. Esto ha afectado no solamente al suelo y sus propiedades, sino también son evidentes los impactos sobre la calidad del aire, agua y la salud humana.

De las investigaciones realizadas, se conoce que uno de los hidrocarburos que potencialmente pueden llegar a contaminar el suelo por accidentes ocurridos, es el combustible conocido como “Fuel Oil” No. 6 (BUNKER).

Este combustible es un producto residual que se obtiene de los procesos de refinación del petróleo crudo y está diseñado para usarse especialmente en hornos, secadores, calderas, y en plantas de generación de energía eléctrica. Químicamente constituido, principalmente por una mezcla compleja y variable de alcanos, alquenos, ciclo alcanos e hidrocarburos aromáticos; que además contiene porcentajes bajos de compuestos que contienen azufre y nitrógeno (SCHMIDT, 1985).

Son las actividades humanas las que condujeron a un aumento dramático de los niveles de estos agentes contaminantes en todo el mundo (CURTOSI, Antonio; *et al.*, 2003). Es importante buscar alternativas que minimicen los efectos de los hidrocarburos aromáticos policíclicos en el ambiente, ya que representan un mayor interés debido a la toxicidad de muchos de ellos y a la frecuencia con la que se detectan (CORONA, Liliana e ITURBE Rosario, 2005).

En este contexto, nuestro país al ser productor de petróleo y consumidor de sus derivados, existe un peligro inminente de producir daño medioambiental, razón por la

cual es importante contribuir con tecnologías encaminadas a mantener un equilibrio en el medio ambiente. Igualmente el país posee grandes reservas y ecosistemas frágiles con una gran biodiversidad, un ejemplo es el parque nacional YASUNÍ que contiene reservas de alrededor de 800 millones de barriles de petróleo, en un área de alrededor 9820km².

Se requiere entonces, buscar alternativas encaminadas a mantener un plan de contingencia actualizado, es importante el uso de técnicas biocorrectoras adaptadas a las condiciones de cada región, permitiendo la eliminación o atenuación de los contaminantes que se generan por las diversas operaciones hidrocarburíferas, o los accidentes que se suscitan en estas actividades extractivas y productivas.

De esta problemática nacional por la incorrecta aplicación de programas de protección ambiental y protocolos de actuación ante eventualidades, etc. Se hace preciso realizar análisis exhaustivos de la toxicidad de suelos impactados con hidrocarburos para ser comparados con la normativa vigente (RAOH, decreto 1215- 2001); Con esto se tendrá conocimiento de las características en las que estos suelos serán depositados y reinsertados nuevamente en el ambiente, se conocerá su toxicidad y los usos que les podrá dar en un futuro inmediato. Con estos antecedentes señalados y como trabajo final de carrera presentamos este estudio denominado “Evaluación de la toxicidad del suelo durante y después de un proceso de biorremediación de hidrocarburos aromáticos policíclicos HAPs”.

JUSTIFICACIÓN.

En base a lo expuesto, nace nuestro interés por investigar el tema, para lo cual utilizamos dos técnicas que sirven principalmente para analizar el estado toxicológico de un suelo biorremediado, como son los bioensayos con semillas y el análisis enzimático del suelo. Basándonos en el supuesto, de que ha mayores concentraciones de hidrocarburos, se producirán mayores efectos tóxicos en el suelo, por lo tanto habrá una menor actividad biológica.

Esta investigación se desarrolla a partir de un suelo biorremediado, producto de una investigación generada en la Universidad Politécnica Salesiana denominado “Valoración de consorcios microbianos en la biorremediación de hidrocarburos aromáticos policíclicos HAPs” y constituye la parte complementaria de dicho proyecto en donde se hace un análisis de la toxicidad del suelo.

El daño o impacto ambiental, no es solamente lo que se aprecia a simple vista, la meta de los procesos de remediación en un suelo deben estar orientados no solamente a disminuir la concentración del contaminante, sino a restaurar la salud del suelo que es aún más importante (INFANTE, Carmen y MORALES, Fernando, 2012).

Entendida la importancia del suelo en el ecosistema, y la significancia de éste en los sistemas productivos como uno de los principales factores de protección del agua por sus diversas funciones de almacenaje, filtración, amortiguación y transformación. (CRAIG, James; *et al.*, 2012).

Se busca determinar su grado de contaminación, valorar los procesos de biorremediación del suelo y determinar la eficacia de los tratamientos aplicados. Todos esos niveles de toxicidad se evalúan mediante bioensayos, los mismos que consisten en exponer organismos vivos a sustancias tóxicas con diferentes concentraciones.

OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL.

- Evaluar la toxicidad del suelo durante y después de un proceso de biorremediación de hidrocarburos en base a la normativa vigente en Ecuador, (RAOH, decreto 1215- 2001) que establece la concentración de hidrocarburos en el suelo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Valorar la actividad enzimática en el suelo, para establecer el estado de las poblaciones microbianas y su relación con la biología del suelo, la producción de biomasa y la biodegradación de los contaminantes (DORAN, J.W; *et al.*, 2002) (GIANFREDA, L y RUGGIERO, P, 2006).
- Evaluar la toxicidad del suelo a través de bioensayos empleando semillas de vegetales.
- Determinar la magnitud de la actividad de diferentes enzimas involucradas en los procesos.
- Valorar la eficacia de los tratamientos (consorcios microbianos) en la biorremediación de suelos impactados por hidrocarburos
- Evaluar el comportamiento enzimático de un suelo contaminado y biorremediado.
- Comparar el efecto tóxico de muestras de suelo contaminadas con hidrocarburos antes y después de un proceso de biorremediación.

HIPOTESIS.

“Las mayores concentraciones de hidrocarburos producirán mayores efectos tóxicos en plantas y demás elementos del suelo” (ROSALDO, 2009); (Trigo - Lechuga - Maíz).

H0= La germinación de semillas de trigo (*Triticum aestivum*), lechuga (*Lactuca sativa*), y semillas de Maíz (*Zea mays*), no son indicadores de la actividad enzimática, y consecuentemente no reflejan la calidad y toxicidad del suelo.

H1= La germinación de semillas de trigo (*Triticum aestivum*), lechuga (*Lactuca sativa*), y semillas de Maíz (*Zea mays*), son indicadores de la actividad enzimática, y consecuentemente reflejan la calidad y toxicidad del suelo.

CAPÍTULO I:

MARCO TEÓRICO.

1. EL SUELO.

Según el TULSMA (Texto Unificado Legislación Secundaria, Medio Ambiente)¹, de procedencia Ecuatoriana, indica que el suelo son todos los medios porosos formados en la superficie terrestre mediante el proceso de meteorización durante largos períodos, aportados por los fenómenos biológicos, geológicos e hidrológicos.

Los suelos se consideran como sistemas biogeoquímicos multicomponentes y abiertos. Están sometidos a los flujos de masa y energía con la atmósfera, la biósfera y la hidrósfera. Su composición es altamente variable; aunque también cambia con el tiempo. Además el suelo es un sistema dinámico de 3 componentes: partículas minerales, detritos y organismos que se alimentan de éstos.

Por lo que podríamos decir que el suelo, o parte superficial de la corteza terrestre, está compuesto de una mezcla de minerales, materia orgánica, bacterias, agua y aire. Formado principalmente por la acción de diversos factores como la temperatura, el agua, el viento, los animales y las plantas sobre las rocas. La combinación de todos estos factores permitió descomponer la roca en partículas muy finas permitiendo la formación de este elemento que es sustento de vida, el suelo.

La ciencia encargada de su estudio es conocida como Edafología, y se ha determinado que entre las funciones principales del suelo están las de almacenaje, filtración, amortiguación y transformación, lo que convierte al suelo en uno de los principales factores para la protección del agua y el intercambio de gases con la

¹ Ministerio del Ambiente, TULSMA, 2014, <http://web.ambiente.gob.ec/?q=node/35>.

atmósfera. Además, constituye un hábitat y una reserva genética, un elemento del paisaje y del patrimonio natural así como una fuente de materias primas.

1.1. PERFIL DEL SUELO.

El perfil consiste de una sucesión de estratos ubicados verticalmente, también conocidos como horizontes en Pedogénesis², que están más o menos diferenciados. Estos estratos pueden deberse a la forma de deposición o sedimentación.

La mezcla de todos estos productos minerales, restos orgánicos y sustancias químicas entre sí, con el agua y el aire intersticial: conforme pasa el tiempo se van diferenciando en el suelo una serie de capas horizontales u horizontes. Al conjunto de capas originadas se les denomina perfil del suelo (THOMPSON, L.M y TROEH, F.R, 1988).

Los horizontes no siempre están bien diferenciados en un suelo, esto dependerá de su madures. Pero se pueden distinguir los siguientes.

1.1.1. Horizonte A.

Es la capa superior, posee mayor actividad biológica, generalmente está enriquecida con materia orgánica y es más oscura que el suelo subyacente. Plantas, animales y sus residuos interactúan con gran cantidad de microorganismos (bacterias, protozoos, hongos, etc.). Posee un bajo contenido de sales minerales y está sujeto a lixiviación.

² Pedogénesis: Proceso de formación de un suelo.

1.1.2. Horizonte B.

Tiene un color más claro por su pobreza en humus, algunos de sus materiales componentes como la arcilla o carbonatos, son filtrados del horizonte A por percolación. Suele ser más grueso que su anterior horizonte. La acumulación de arcilla y la presión de la capa superior reducen la porosidad de las capas más profundas. Esto a veces inhibe la aireación, el drenaje interno de agua y la penetración de las raíces. Presenta acumulación de sales de calcio, aluminio o hierro.

1.1.3. Horizonte C.

Compuesto por el material parental del suelo, procedente de la meteorización mecánica y/o química de la roca madre. Por lo que contiene material rocoso fragmentado y erosionado. Sirve de soporte para los horizontes A y B.

1.1.4. Roca madre D.

Material original sobre el que se desarrolla el suelo, el cual proporciona las características iniciales al suelo dependiendo de su naturaleza y composición. La roca madre puede ser una roca dura, compacta e impermeable (CRAIG, James; *et al.*, 2012).

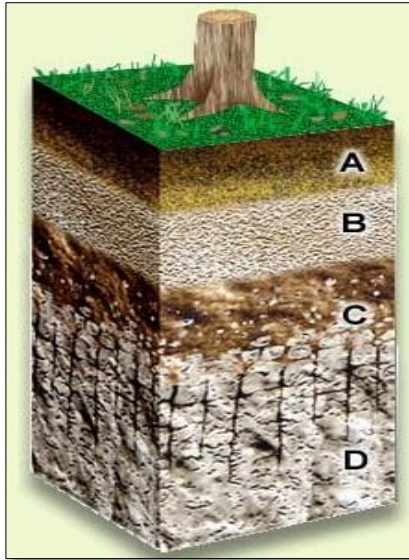


Ilustración 1. Perfiles del suelo, 2005.

Fuente <http://www.madrimasd.org/blogs/universo/2008/10/02/102439>

1.2. COMPOSICIÓN.

El suelo, es conocido por ser un elemento contenedor de vida, con una gran variedad de microorganismos entre los que encontramos bacterias, hongos, algas y protozoos. Todos estos organismos resultan benéficos y cumplen un rol importante ante la presencia de agentes contaminantes.

La composición de los suelos al igual que sus diversos componentes, puede variar con el tiempo, haciendo referencia a su estado de meteorización y la distribución de sus partículas componentes. Por otra parte de un lugar a otro, puede variar según las características de cada lugar y los elementos constitutivos de la roca madre, por esta razón no todos los suelos son iguales.

Por lo tanto al ser el suelo un sistema natural, que como cualquier otro está constituido por una serie de elementos, entre los cuales se pueden diferenciar tres fases importantes para su buen funcionamiento, estas son: fase Sólida, fase Líquida y fase Gaseosa. Siendo la fase líquida, la solución del suelo (agua dispersa que pasa a través de

los poros que lo constituyen). La gaseosa, el aire que atraviesa los espacios porosos; y finalmente la sólida, representada por el suelo y los componentes sólidos que lo constituyen, como ejemplo tenemos a los minerales.

Estas tres fases interactúan bajo la influencia de factores formadores del suelo, entre los que podemos destacar: el clima, relieve, biota, material parental (material geológico inalterado) y tiempo; quienes con sus efectos, ayudan a la formación del suelo y a que prevalezca la vida en el mismo (FAO, Base referencia mundial del recurso suelo, 2006).

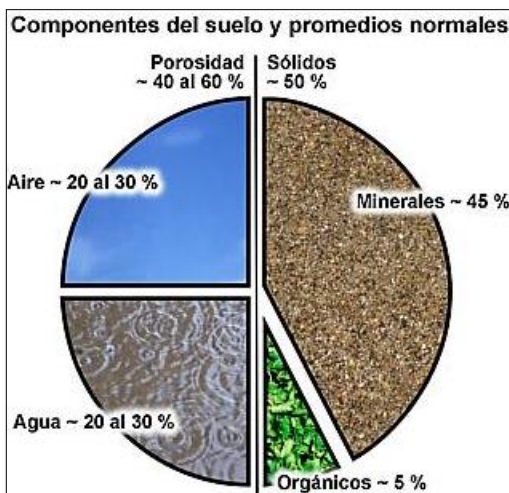


Ilustración 2. Componentes del Suelo, 2010.

Fuente http://wegc203116.uni-graz.at/meted/hydro/basic/HydrologicCycle_es/print_version/04-surface_water.htm

1.2.1. Fase sólida.

La fase sólida es la predominante en el suelo, está constituida por los productos del proceso de intemperización de la roca madre, contiene minerales (óxidos de silicio, aluminio y hierro), materia orgánica (organismos vivos en gran actividad química y biológica, organismos muertos en diferentes etapas de descomposición). Su parte mineral está formada por partículas de diferentes tamaños, formas y composiciones

químicas. Por lo que esta fase es considerada como esqueleto mineral del suelo (JORDÁN, 2006).

Entre estos, componentes sólidos, del suelo se destacan:

- **Silicatos:** Tanto residuales o no completamente meteorizados, (Micas, Feldespatos y fundamentalmente Cuarzo).
- **Productos no plenamente formados:** Singularmente los minerales de arcilla, (Caolinita, Illita, etc.).
- **Óxidos e hidróxidos de hierro (Fe):** (Hematites, Limonita, Goethita).
- **Óxidos e hidróxidos de aluminio (Al):** (Gibbsita, Boehmita).
- **Clastos y granos poliminerale:** Como materiales residuales de la alteración mecánica y química incompleta de la roca originaria.

Y otros diversos compuestos minerales cuya presencia o ausencia y abundancia condicionan el tipo de suelo y su evolución.

- **Carbonatos:** (Calcita, Dolomita, Carbonato de sodio).
- **Sulfatos:** (Aljez o yeso mineral, Sulfato de magnesio, Sulfato de sodio).
- **Cloruros:** (Cloruro de magnesio, Cloruro de sodio, Cloruro de potasio).
- **Nitratos:** (Nitrato de sodio, Nitrato de potasio).³

³ Contaminación del suelo, Contaminación por sales solubles, 2003, <http://edafologia.ugr.es/conta/tema12/sales.htm>

- **Sólidos de naturaleza orgánica o complejos órgano-minerales:** La materia orgánica muerta existente sobre la superficie, el humus o mantillo, que a su vez se divide en:
 - **Humus joven o bruto:** Formado por restos distinguibles de hojas, ramas y restos de animales.
 - **Humus elaborado:** Formado por sustancias orgánicas resultantes de la total descomposición del humus bruto, de un color negro, con mezcla de derivados nitrogenados (amoníaco, nitratos), hidrocarburos, celulosa, etc. Según el tipo de reacción ácido-base que predomine en el suelo, éste puede ser ácido, neutro o alcalino, lo que viene determinado también por la roca madre.

1.2.2. Fase Líquida.

La fase líquida, es una solución acuosa de composición química variable, constituida por varios elementos químicos solubles en agua. Llena parte o la totalidad de los espacios (poros) que forman las partículas sólidas del suelo y es por donde se mueve o transita la solución.

Esta solución es el medio de dispersión que envuelve a las partículas individuales de suelo y tiende a llenar los poros entre las partículas sólidas.

La fase líquida del suelo está formada por la solución del suelo que proporciona los nutrientes a las plantas y es el medio en el que se llevan a cabo la mayoría de reacciones químicas. Sus iones más comunes son Na, Mg, Mn, Cu, Zn, Al, Fe, Si, NH₄, K, Ca, Cl, NO₃, etc. A esta fase se la considera como el vehículo de transporte (CRAIG, James; *et al.*, 2012).

1.2.3. Fase Gaseosa.

La fase de vapor o gaseosa, está formada principalmente por gases atmosféricos (aire), entre los que encontramos Nitrógeno (N), Oxígeno (O), vapor de agua, Argón (Ar), Dióxido de Carbono (CO₂), Amonio (NH₄), entre otros. La composición tiene gran variabilidad en cuanto a concentraciones, por el consumo de Oxígeno, y la producción de CO₂.

Ocupa los poros del suelo que no están invadidos por la fase líquida y tiene una composición que puede variar en intervalos de tiempo cortos. El Oxígeno (O₂) es siempre menos abundante que en el aire libre y el Dióxido de Carbono (CO₂) aún menor. Como consecuencia del metabolismo respiratorio de los seres vivos del suelo, incluidas las raíces y los hongos, que pueden trabajar en fases aerobias o anaerobias.

Otros gases comunes en suelos con mal drenaje son el metano (CH₄) y el óxido nitroso (N₂O).

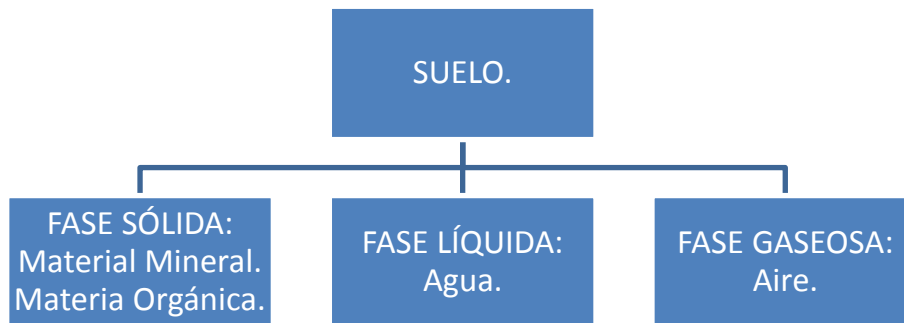


Tabla 1. Fases del suelo, 2013.

Fuente los Autores.

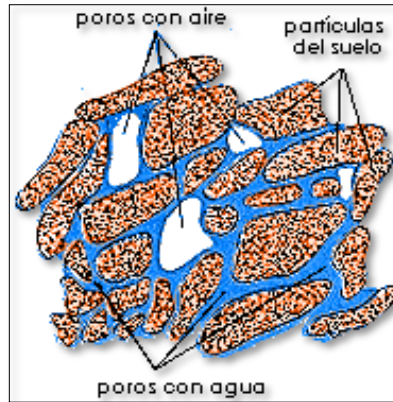


Ilustración 3. Distribución de los poros en el suelo, 2010.

Fuente <http://www.tesis.bioetica.org/pab2-1.htm>

1.3. COMPONENTES INORGÁNICOS DEL SUELO.

Los componentes inorgánicos del suelo son de naturaleza mineral, siendo el más importante el Silicio (Si), que en sus distintas combinaciones con otros elementos forma la arcilla, el limo y las arenas.

Los componentes inorgánicos son el resultado del menor o mayor desgaste de las rocas como consecuencia de la acción de los agentes erosivos. Los fragmentos desprendidos de las rocas son transportados por el viento y el agua, estos se acumulan rellenando las zonas más bajas del terreno, tomando la disposición en estratos de acuerdo a su peso y tamaño. Las partículas más grandes y pesadas (grava, arenas) quedan bajo montones de otros materiales de partículas más pequeñas y livianas como por ejemplo limo y arcillas (ADAMS, 1995).

Los componentes inorgánicos del suelo se clasifican habitualmente, en función de su tamaño. Sin embargo, desde el punto de vista de su dinámica química se pueden separar en dos grupos bien delimitados.

- Fracciones no coloidales: (Piedras, gravas, arenas y limo).
- Fracciones coloidales: (Arcillas).

1.3.1. Fracciones no coloidales.

Constituidos mayoritariamente por piedras y gravas. Que poseen un diámetro de entre 5 y 2 cm; mientras las gravas un diámetro de 2 y 0,2 cm. Pueden constituir, una reserva de elementos nutritivos a largo plazo y si son lo suficientemente porosas, conservarán cierta cantidad de humedad. Cuando su presencia es elevada se considera más negativa que positiva, ya que reducen disponibilidad de nutrientes, al disminuir el volumen de suelo disponible, lo que se traduce en un suelo bajo en nutrientes.

Las arenas gruesas y finas, con un tamaño entre 2 y 0,05mm, presentan diversas formas, son muy permeables y carecen de plasticidad, a esto se debe la condición de que en los suelos, en los que predomina la arena tienen un buen sistema de drenaje y aireación; por ello los suelos muy arenosos se calientan o enfrían rápidamente.

Los limos son considerados como partículas de arena microscópicas, con un tamaño entre 0,05 y 0,02mm. El cuarzo es el mineral predominante, en menor proporción se encuentran pequeños fragmentos de feldespatos, micas y óxidos e hidróxidos de hierro. Posee ciertas características como plasticidad, cohesión y propiedades adsorbentes, debido a las partículas de arcilla que llevan adheridas. Tienen una fertilidad química aceptable, presentan un inconveniente su gran impermeabilidad. Por esa razón el limo no es un constituyente apropiado para un suelo, a menos que junto a él se encuentren cantidades suficientes de materia orgánica, arenas y arcilla (NAVARRO, Simon y NAVARRO Gines, 2003).

1.3.2. Fracciones coloidales.

Arcillas.

Las partículas minerales más finas del suelo con diámetro menor que 0,002 mm constituyen la fracción conocida o denominada “arcilla”. Los cationes que acompañan a

la partícula coloidal de arcilla son H, o por cationes metálicas Calcio (Ca), Magnesio (Mg), Potasio (K) y Sodio (Na) principalmente.

En menor proporción se encuentra Amonio (NH₄), Manganeso (Mn), Cobre (Cu) y Zinc (Zn).

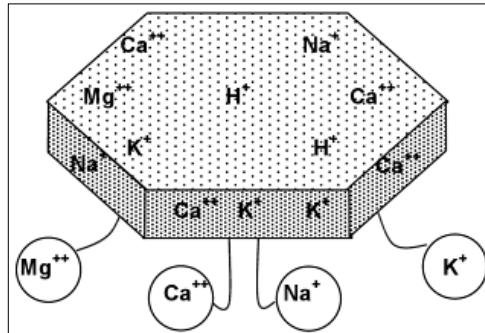


Ilustración 4. Componentes químicos del suelo, 2003.

Fuente: Adams Melitón.

1.4. FORMACIÓN.

El suelo proviene de la interacción entre la atmósfera y biosfera. Se forma a partir de la descomposición de la roca madre, por factores climáticos y la acción de los seres vivos. Esto implica que el suelo tiene una parte mineral y otra biológica; permitiéndole ser el sustento de una multitud de especies, tanto vegetales, animales y de microorganismos.

La descomposición de la roca madre puede deberse a factores físicos y mecánicos, o por otros factores como alteración y descomposición química. En este proceso se forman unos elementos muy pequeños que conforman el suelo; los coloides y los iones, que dependiendo del porcentaje de concentración de los mismos, y de su origen, por lo tanto el suelo tendrá determinadas características en cuanto a textura, estructura, porosidad, color, etc. (NAVARRO, Simon y NAVARRO Gines, 2003).

La pedología es la ciencia que trata de los factores y procesos de formación del suelo; incluyendo la descripción e interpretación de sus perfiles y el estudio de sus propiedades. En este contexto el científico ruso V.V Dokuchaev en 1983, destacó que todos los suelos de la superficie terrestre están formados por la interacción compleja de factores naturales como el clima, las plantas, animales, microorganismos, la roca madre, topografía y finalmente la edad del suelo tiempo, (CRAIG, James; *et al.*, 2012).

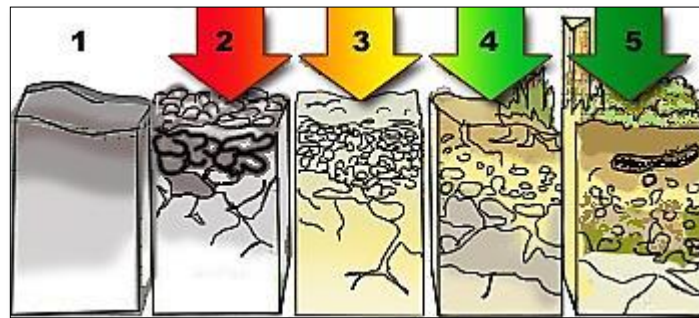


Ilustración 5. Formación del suelo, 2010.

Fuente <http://suelos-25dejulio.blogspot.com/2012/06/factores-que-influyen-en-la-formacion-y.html>

1.4.1. La materia orgánica en la formación del suelo.

La materia orgánica del suelo constituye solo una pequeña parte del total de la fase sólida. Pero desempeña una gran función, no sólo en el hecho de mejorar las propiedades físicas, químicas y estructurales de un suelo, sino también respecto al desarrollo de los cultivos. Constituye todas las sustancias de origen animal y vegetal que se acumulan o apilan a los suelos, independientemente de su fase de descomposición.

La materia orgánica procede fundamentalmente, de la vegetación que se establece en la roca madre; la descomposición de estos aportes, forma el humus bruto, ha estos restos orgánico – vegetales, se añaden los procedentes de la descomposición de los aportes de la fauna, aunque en el porcentaje total, son de menor importancia. La descomposición de la materia orgánica aporta al suelo diferentes minerales y gases: amoníaco, nitratos, fosfatos. Estos son elementos esenciales para el metabolismo de los

seres vivos y conforman la reserva trófica del suelo para las plantas (RUSSELL E.J y WILD Alan, 1988).

Así, el término materia orgánica comprende, no solo la fracción del suelo sumamente descompuesta, oscura y de naturaleza coloidal conocida como Humus; sino también otros materiales como raíces, parte aérea de plantas (hojas, tallos, ramas), cuerpos de microorganismos, gusanos, insectos y demás animales que ahí puedan existir y que se encuentran normalmente en el suelo, todos estos componentes anteriormente nombrados contribuyen en gran medida a incrementar la fertilidad del terreno.



Ilustración 6. Materia orgánica del suelo, 2003.

Fuente <http://www.faunatura.com/crear-compost-forma-artesana.html>

COMPONENTES QUÍMICOS DEL MATERIAL ORIGINARIO DE LA MATERIA ORGÁNICA DEL SUELO.	
Hidratos de Carbono.	Monosacáridos: Pentosas, hexosas.
	Oligosacáridos: Sacarosa, maltosa.
	Polisacáridos: Arabanas, poliuronidos.
Ligninas.	Polímeros derivados del fenilpropano.
Taninos.	Complejos fenólicos.
Glucósidos.	Compuestos de glucosa + alcohol, fenol o aldehídos.
Ácidos orgánicos, sales y ésteres.	Ácidos oxálicos, cítrico, málico.
Lípidos y afines.	Grasas y aceites: esteres glicéricos.
	Ceras, esteres no glicéricos.
	Ácidos resinicos.
Resinas.	Ácidos resinicos.
Compuestos Nitrogenados.	Proteínas, aminoácidos, aminas y bases orgánicas.
	Alcaloides.
	Purinas, pirimidinas, ácidos nucleicos.
Pigmentos.	Clorofilas.
	Carotenoides.
	Antocianinas.
Compuestos Minerales.	Aniones y cationes.

Tabla 2. Componentes químicos de la materia orgánica del suelo, 2013.

Fuente los autores.

1.4.2. Las rocas como factor formador del suelo.

La composición química, mecánica y mineralógica de los suelos en sus primeras etapas de desarrollo, están determinadas por la composición de rocas formadoras. En etapas de evolución y desarrollo posteriores, cuando se forman los perfiles de suelos maduros, con horizontes bien diferenciados, los suelos adquieren propiedades muy diferentes a los de la roca inicial.

No obstante las rocas formadoras del suelo ejercen una fuerte influencia, tanto en su composición, consistencia, permeabilidad y por su origen, que influencia en la velocidad e intensidad de los procesos que en el mismo tienen lugar (HERNÁNDEZ, Alberto; *et al.*, 2006).

1.4.2.1. Por su composición química mineralógica.

Las rocas formadoras del suelo se dividen en ácidas, intermedias, básicas y ultra básicas. Según el contenido de sílice (SiO₂), de cuarzo y minerales ferromagnesianos. No es lo mismo la formación del suelo a partir de rocas con alto contenido de cuarzo y feldespatos; que sobre serpentinita rica en olivino (ferromagnésial).

1.4.2.2. Por su consistencia.

Las rocas formadoras del suelo se dividen en mullidas y compactas, estas influyen en la velocidad de las transformaciones que ocurren durante el proceso o los procesos de formación del suelo. Se puede encontrar diferencias también en las rocas madres por el grado de permeabilidad y absorción de agua.

1.4.2.3. Por su origen.

Pueden ser ígneas, formadas a partir del enfriamiento del magma; sedimentarias, formadas en zonas superficiales de la corteza terrestre a partir de materiales que se depositan formando capas o estratos; por último metamórficas, que son las formadas a partir de otras rocas que, han estado sometidas a grandes presiones y temperaturas. Además se incluyen los sedimentos (aluviales, coluviales, deluviales y cenizas volcánicas) como materiales originarios de los diversos tipos de suelos.

1.5. EL CLIMA Y LA FORMACIÓN DEL SUELO.

El rol del clima es muy complejo, con sus variadas formas de acción que ejerce sobre la formación y distribución de los suelos. Entre los elementos que más inciden esta la radiación solar y los procesos dinámicos de la atmósfera; siendo los encargados de trasladar la humedad (precipitaciones) o el calor (temperatura). La radiación solar es la principal fuente de energía para la actividad biológica y los procesos que ocurren en el suelo; esta se absorbe por la superficie terrestre, más tarde se irradia y se reparte nuevamente en el proceso de la dinámica atmosférica⁴.

La humedad de las precipitaciones, es absorbida por las plantas y se reintegra a la atmósfera a través de procesos de evapotranspiración. De esta manera se establece un cambio hidrotérmico constante entre el suelo y la atmósfera. El agua debido a las precipitaciones penetra en las fisuras de las rocas o interacciona con los sedimentos y provoca reacciones químicas de hidrólisis y carbonatación, que dan lugar a transformaciones mineralógicas, que conjuntamente con la acción de residuos vegetales conlleva a la formación del suelo. Todo este proceso se ve acelerado por el calor (HERNÁNDEZ, Alberto; *et al.*, 2006).

1.6. PROPIEDADES DEL SUELO.

El suelo es una combinación de materiales sólidos, líquidos y gaseosos⁵. La proporción de los componentes determina una serie de propiedades que se conocen como propiedades físicas o mecánicas del suelo: estructura, textura, color, permeabilidad, porosidad, drenaje, consistencia, profundidad efectiva. (FASSBENDER, 1975).

⁴HERNÁNDEZ Alberto, ASCANIO Miguel, MORALES Marisol, BOJÓRQUEZ José, GARCÍA Norma, GARCÍA Juan, El suelo: fundamentos sobre su formación, los cambios globales y su manejo, 2006, <http://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=LdIARhjVZN4C&oi=fnd&pg=PA11&dq=Formaci%C3%B3n+del+suelo&ots=mSXZ0nPPHB&sig=8FEaF-GudyeNZysxEKAbYUk1RfM#v=onepage&q&f=true>

⁵ FASSBENDER Hans, Química de suelos con énfasis en suelos de América Latina, 1975, <http://books.google.es/books?id=EtIOAQAIAAJ&printsec=frontcover&dq=editions:e9T6B54OPgUC&hl=es&sa=X&ei=BwGmUv3JLtDNkQexyIHABg&ved=0CDkQ6AEwAQ#v=onepage&q&f=false>

1.7. ESTRUCTURA DEL SUELO.

La estructura del suelo, está definida por la forma de agrupación de partículas individuales: arena, limo y arcilla. Cuando las partículas individuales se agrupan, toman el aspecto de partículas mayores, denominadas agregados. Las partículas son de formas irregulares y contienen unos pequeños espacios llamados poros. Estos contienen agua o aire; entonces podemos decir, que el suelo es permeable cuando el agua se infiltra con facilidad a través de sus partículas.

Un suelo conveniente, es aquel con poros grandes que permiten la filtración de la lluvia, buena aireación y mayor drenaje. Ya que los poros de menor tamaño, aseguran mayor retención de agua; de acuerdo a esto existen diferentes estructuras:

1.7.1.1. Estructura débil.

Está formada, por indistintos agregados apenas visibles. Cuando se extrae del perfil del suelo, los materiales se rompen dando lugar a una mezcla de escasos agregados intactos, muchos quebrados y mucho material no compactado.

1.7.1.2. Estructura moderada.

Se caracterizan por tener agregados diferenciados, de duración moderada. Cuando se extrae del perfil, el material edáfico se rompe, en una mezcla de varios agregados enteros distintos, algunos rotos y poco material no compactado.

1.7.1.3. Estructura fuerte.

Posee agregados bien formados, diferenciados y duraderos. Evidentes en suelos no alterados. Cuando se extrae del perfil, el material está integrado principalmente por

agregados enteros e incluye algunos quebrados y poco o nulo material no compactado (CASANOVA, 2005).

1.8. TEXTURA DEL SUELO.

La textura es un medio para describir el tamaño y la proporción de las partículas presentes en el suelo. Tiene mucho que ver con el tránsito de aire, agua y raíces a través del suelo, por lo que definirá la capacidad de absorción y retención de agua, la cantidad de aire contenido, su capacidad en cuanto a fertilidad⁶. Por ejemplo los materiales arenosos suelen imponer pocas restricciones a esos movimientos, mientras que los materiales arcillosos, con frecuencia retrasan o impiden el paso de aire, agua o raíces. Como otro ejemplo los suelos arcillosos son capaces de retener mucha más agua que los arenosos (SÁNCHEZ, Pedro; *et al.*, 1981).

1.8.1. Textura arcillosa.

Un suelo con textura arcillosa es aquel en el que predomina la arcilla, las texturas arcillosas dan suelos plásticos y difíciles de trabajar. Retienen gran cantidad de agua y de nutrientes debido a su micro porosidad y a su elevada capacidad de intercambio catiónico. Aunque retengan agua en cantidad presentan una permeabilidad baja, salvo que estén bien estructurados y formen un buen sistema de grietas.

1.8.2. Textura arenosa.

La textura arenosa es la contrapuesta a la arcillosa, pues cuando en superficie hay una textura arenosa los suelos se conocen como ligeros, dada su escasa plasticidad y facilidad de trabajo. Presentan una excelente aireación debido a que las partículas

⁶ SÁNCHEZ Pedro, Suelos del trópico, características y manejo, 1981, <http://books.google.es/books?id=20MMFDmtGAC&pg=PA99&dq=propiedades+del+suelo&hl=es&sa=X&ei=hQCmUsiTKcnLkQe6moGYBQ&ved=0CFkQ6AEwBw#v=onepage&q=textura%20del%20suelo&f=false>

dominantes de gran tamaño facilitan la penetración del aire. Únicamente cuando se producen lluvias intensas se puede producir encharcamiento o escorrentía, generando erosión laminar. La acumulación de materia orgánica es mínima y el lavado de los elementos minerales es elevado.

1.8.3. Textura franca.

En un suelo con textura franca abunda el limo; es algo intermedio a los dos anteriores; ni es arcilloso, ni es arenoso. Por eso se los conoce como equilibrados al tener una mayor armonía entre sus componentes, gozan de las características favorables de los anteriores sin sufrir sus defectos, el estado ideal sería la textura franca y a medida que nos desviamos de ella se van mostrando los inconvenientes derivados. Los suelos francos son típicos los de las riberas de los ríos.

1.8.4. Textura franco-arcillosa.

Entre arcilloso - franco; tienen bastante arcilla pero también están acompañados de mucho limo y con un contenido escaso de arena. Es un suelo de textura fina que usualmente se quiebra en pedazos duros cuando éstos están secos. El suelo en estado húmedo al oprimirse forma una cinta que se quiebra fácilmente al sostener su propio peso, con la humedad necesaria será plástico y formará un molde que soporta la manipulación.

1.8.5. Textura franco-arenosa.

Entre franco y arenoso; es un suelo que posee bastante arena, pero que también cuenta con limo y arcilla, lo cual le otorga algo más de coherencia entre partículas, los granos de arena se ven a simple vista, si está seco forma un molde que caerá en pedazos; si está húmedo puede ser objeto de manipulación (STOCKING, Michael y MURNAGHAN, Niamh, 2001).

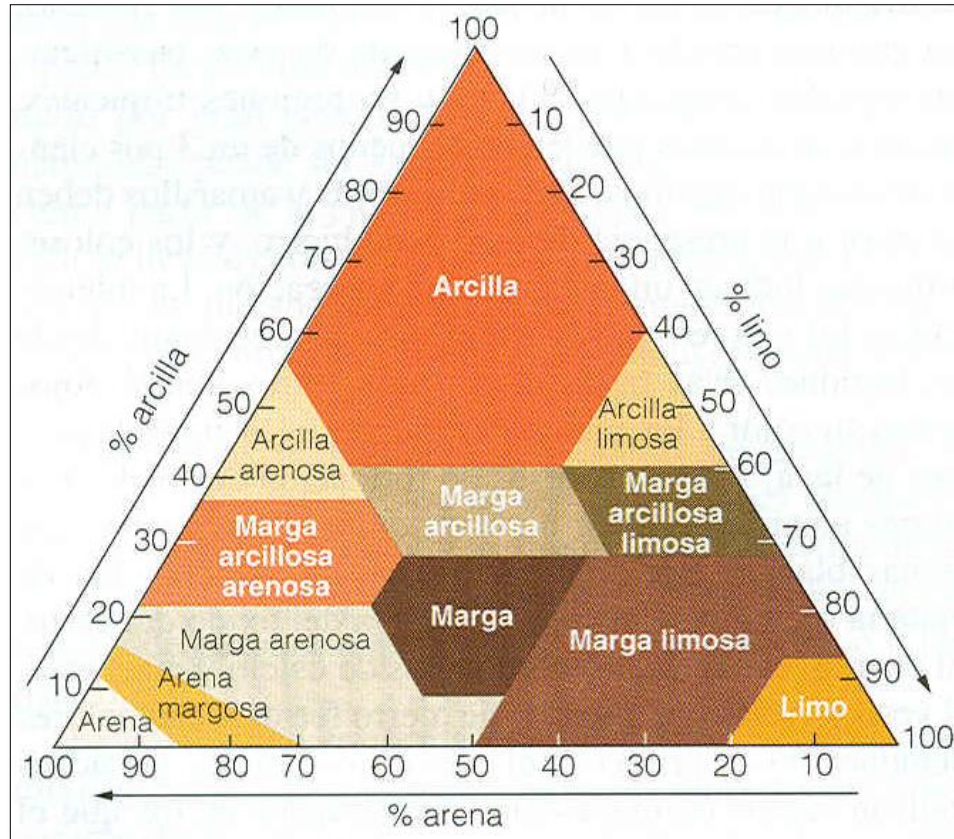


Ilustración 7. Texturas del suelo, 2010.

Fuente <http://edafologia.ugr.es/introeda/tema04/text.htm>

1.9. COLOR DEL SUELO.

El color del suelo es una de las características morfológicas más importantes, es la más obvia y fácil de determinar. Permite identificar las distintas clases de suelos; es el atributo más relevante utilizado en la separación de horizontes y tiene una estrecha relación con los principales componentes sólidos, que forman parte de este recurso.

Los factores que influyen en la apreciación del color son: la calidad e intensidad de la luz, la rugosidad de la superficie reflectora y la humedad de la muestra. La medición del color del suelo, se realiza mediante la comparación de la muestra con las

placas de colores que componen cada uno de los diversos matices⁷. El color puede ser utilizado como una clave del contenido de ciertos minerales en el suelo, fundamentalmente minerales férricos ya que ellos proveen la mayoría y la mayor variedad de pigmentos al suelo. Se describe una variedad de colores, entre los que encontramos: negros, rojos, amarillos, marrones, grises, entre otros; y su relación con determinadas condiciones ambientales del lugar en el que se encuentren. (CASANOVA, 2005).

1.10. PERMEABILIDAD.

Permeabilidad es la propiedad que tiene el suelo de permitirle a un flujo, que lo atraviese sin alterar su estructura interna, mientras más permeable sea el suelo, mayor será la tasa de filtración. Muchos factores afectan a la permeabilidad del suelo, como por ejemplo la densidad del suelo, su grado de saturación y el tamaño de partículas. Pero la observación sobre la textura del suelo, su estructura, consistencia, color, la disposición por capas, los poros visibles, la profundidad de las capas impermeables como la roca madre y la capa de arcilla, constituyen la base para decidir si es probable que las mediciones de la permeabilidad sean representativas⁸.

El tamaño y el número de los poros guardan estrecha relación con la textura y la estructura del suelo. También influyen de una manera importante en su permeabilidad. (THOMPSON, L.M y TROEH, F.R, 1988).

La permeabilidad del suelo suele medirse en función de la velocidad del flujo de agua a través de éste durante un período determinado. Generalmente se expresa en

⁷ CASANOVA, Eduardo, Introducción a la ciencia del suelo, 2005, <http://books.google.es/books?id=k4FXuHW1ozQC&pg=PA171&dq=color+del+suelo&hl=es&sa=X&ei=axCmUqfrOce0kQfim4Aw&ved=0CEoQ6AEwAw#v=onepage&q=color%20del%20suelo&f=false>

⁸ THOMPSON L.M, TROEH F.R, Los suelos y su fertilidad, 2002, <http://books.google.es/books?id=AegjDhEIVAQC&pg=PA121&dq=permeabilidad+del+suelo&hl=es&sa=X&ei=3gumUuGHs7qkAfg44DwBw&ved=0CEoQ6AEwBA#v=onepage&q=permeabilidad%20del%20suelo&f=false>

centímetros por hora (cm/h), milímetros por hora (mm/h), o centímetros por día (cm/d), según la unidad de conveniencia.

Formula permeabilidad, Ver anexo A.

1.11. POROSIDAD.

Se define como el espacio de suelo que no está ocupado por sólidos y se expresa en porcentajes; se define también como la porción de suelo que está ocupada por aire y/o por agua, en otras palabras la porosidad es la capacidad del suelo de drenar el exceso de agua con facilidad (DE LA ROSA, 2008).

En suelos secos los poros estarán ocupados por aire y en los inundados por agua. Los factores que lo determinan son la textura, estructura y la cantidad de materia orgánica (MONTT, 2006).

Formula porosidad, Ver anexo B.

1.12. DRENAJE.

El drenaje se refiere a la permeabilidad y transmisibilidad del suelo, es decir, la facilidad para que el agua circule, evacuándola en vez de estancándola. Por ejemplo un suelo muy permeable (arenas y gravas) tiene un buen drenaje, es decir, el agua infiltrada circula fácilmente⁹. Un suelo arcilloso es muy poco o nada permeable, por lo que el agua tendrá dificultad para circular, es decir, tiene poco o ningún drenaje (HUDSON, 2006).

⁹ HUDSON Norman, Conservación del suelo, 2006, <http://books.google.es/books?id=u137pQPxYGAC&pg=PA169&dq=drenaje+del+suelo&hl=es&sa=X&ei=GRemUqTVHNDxkQfqpIGoAQ&ved=0CEYQ6AEwAg#v=onepage&q=drenaje%20del%20suelo&f=false>

1.13. CONSISTENCIA.

La consistencia del suelo es la firmeza con que se unen los materiales que lo componen, o la resistencia de los suelos a la deformación y la ruptura, esto depende de las fuerzas físicas de adhesión y cohesión.

La consistencia del suelo se mide por muestras de suelo mojado, húmedo y seco. En los suelos mojados, se expresa como adhesividad y plasticidad.

Este parámetro varía según la textura, materia orgánica presente, cantidad y naturaleza del material coloidal, por último y especialmente por el contenido de humedad (FAO, FAO.org, 2005).

1.14. PROFUNDIDAD EFECTIVA.

Se define como la profundidad de la tierra, en la que las raíces de las plantas, pueden penetrar sin mayores obstáculos, para conseguir el agua y los nutrientes necesarios para su desarrollo (REYES, Genaro; *et al.*, 2005).

Los suelos pueden clasificarse en cuatro grupos, de acuerdo con su profundidad efectiva¹⁰:

- Suelos profundos tienen un metro o más hasta llegar a una capa limitante.
- Moderadamente profundos tienen menos de un metro pero más de 0.60 m.
- Suelos poco profundos tienen menos de un metro y menos de 0.60 m.
- Suelos someros tienen menos de 0.25 m.

¹⁰REYES Genaro, VÁZQUEZ Rogelio, TRÉMOLS Abdón, Introducción a la agroquímica, 2002, <http://books.google.es/books?id=DIUWWgEZr5YC&pg=PA9&dq=profundidad+efectiva+del+suelo&hl=es&sa=X&ei=lximUuyYIsarkAf0g4DgCQ&ved=0CD8Q6AEwAg#v=onepage&q=profundidad%20efectiva%20del%20suelo&f=false>

2. TIPOS DE SUELO.

Según el departamento de Agricultura de Estados Unidos (U.S.D.A) en 1938, reconoce tres órdenes de suelos, entre los distinguen: SUELOS ZONALES, INTRAZONALES y AZONALES; en cada uno de ellos, con sus subórdenes y grupos. En esta clasificación se basan las clasificaciones más utilizadas tradicionalmente (CRAIG, James; *et al.*, 2012).

Los tipos de suelo, Ver Anexo C.

2.1. ORDEN DE LOS SUELOS SEGÚN SU TAXONOMÍA.

Tomando en cuenta a (Soil Survey Staff) Taxonomía Americana de Suelos, la clasificación de la USDA (United States Department of Agriculture) y lo expuesto por (MORENO, Héctor; *et al.*, 2011) en su libro hemos considerado la siguiente clasificación.

2.1.1. Alfisoles.

Su nombre se debe a los símbolos químicos Al y Fe, que son los predominantes en su desarrollo; formados en superficies jóvenes, por lo tanto no tienen grandes reservas de minerales primarios. Tienen un horizonte sub superficial con un enriquecimiento secundario de arcillas desarrollado en condiciones de acidez o de alcalinidad sódica. Con un horizonte superficial claro, generalmente pobre en materia orgánica y de poco espesor; la mayoría de los Alfisoles se forman bajo vegetación forestal, presentan una alta saturación de bases en todo el perfil; una característica importante de estos suelos es su régimen de humedad ya que son capaces de suministrar agua a las plantas durante más de la mitad del año o por lo menos durante más de tres meses consecutivos.

2.1.2. Andisoles.

Son suelos que se dan en todos los regímenes de humedad y temperatura, dependiendo de las condiciones climáticas de su entorno. Su evolución será más o menos rápida; dependiendo del lugar en el que se desarrolle por ejemplo, mucho más deprisa en una zona tropical que en una árida. Es por eso que el clima es un factor formador influyente, puesto que la precipitación y la temperatura van a ejercer una implicación directa en la meteorización de los materiales volcánicos sobre los que se desarrollan; por último la temperatura, va a ser la gran variable controladora de la velocidad de las reacciones químicas.

Estos suelos se caracterizan por poseer altos contenidos de materia orgánica, alta capacidad de fijar fosfatos y baja densidad aparente (peso seco del suelo). Presentan determinados contenidos de aluminio y de hierro. Pero su principal característica es que se trata de suelos con propiedades Ándicas (de los Andes) desarrollados sobre materiales procedentes de erupciones volcánicas.

2.1.3. Aridisoles.

Son suelos que están presentes en regiones áridas, ya sean estas frías o cálidas, por eso es que la meteorización química es un proceso poco activo debido a la falta de agua, lo que conlleva a una baja tasa de producción de humus. Por lo tanto no son suelos aptos para el desarrollo de cultivos ya que no disponen de agua suficiente durante largos períodos y por la presencia de sales solubles en superficie que limitan el crecimiento de vegetación en el entorno.

Se asocian con una vegetación escasa que no cubre completamente la superficie del suelo; presentan un horizonte superficial claro y pobre en materia orgánica, la mayor parte de ellos presentan reacciones alcalinas, con estas características y al ser claramente limitados en cuanto a la productividad de los cultivos, se han buscado mecanismos que permitan mejorar su productividad, no obstante con el avance de la agricultura, se han

desarrollado grandes extensiones de cultivo, bajo condiciones de riego. Los aprovechamientos forestales, prácticamente son nulos; pero aunque desde el punto de vista medioambiental presentan una rica fauna y flora endémica.

2.1.4. Entisoles.

Son suelos muy jóvenes con poca diferenciación de horizontes; desarrollados sobre material parental no consolidado, en su mayoría solamente tienen un horizonte superficial claro, de poco espesor y generalmente pobre en materia orgánica. Se desarrollan en distintos regímenes de humedad, temperatura, vegetación y materiales parentales. Sus propiedades están por ello fuertemente determinadas por el material original, considerados suelos típicos de ladera, donde la escorrentía no permite la evolución de los suelos en profundidad a causa de la erosión hídrica.

No obstante son suelos potencialmente muy fértiles debido a los diferentes aluviones recibidos, utilizándose principalmente para cultivos hortícolas y frutícolas.

2.1.5. Gelisoles.

Son suelos con materiales géllicos sobre la superficie del permafrost, el permafrost es el suelo o la fracción de éste que se encuentra permanentemente helado por debajo de 0°C durante dos o más años. Es en esta capa donde se encuentran los materiales géllicos, que son materiales minerales u orgánicos que presentan evidencia de crioturbación¹¹.

La congelación y la descongelación son los procesos más importantes que suceden en este tipo de suelos, pudiendo estar o no presentes horizontes. Su propiedad más característica, que hace que se distingan del resto de órdenes es la de ser suelos que

¹¹ Crioturbación: Acción de hielo-deshielo en suelos que provoca una serie de movimientos verticales, laterales y de fisura superficial que modifican su consistencia y favorecen su fluidificación, rompiendo su estructura y dándole un aspecto caótico.

tienen permafrost y/o materiales gélidos. Por esta razón presentan importantes problemas en su manejo, no sólo por sus batimientos, levantamientos y agrietamientos, sino también porque tras el deshielo del permafrost se produce un cambio en el régimen térmico que conduce al hundimiento del suelo. Tienen una cubierta vegetal muy variable en las que se incluyen zonas desde la ausencia total de vegetación hasta territorios con vegetación de tundra, bosques sub árticos y boreales, y algo de tundra alpina.

2.1.6. Histosoles.

Son suelos típicos de zonas húmedas que tienen un elevado contenido de materiales orgánicos más o menos descompuestos y una densidad aparente muy baja, están saturados con agua y tienen una capacidad de retención de humedad muy alta. Se forman en condiciones húmedas o frías, están presentes en la mayoría de las zonas pantanosas, ciénagas y turberas (humedal ácido).

Están compuestos de restos de plantas más o menos descompuestas en condiciones hidromorfas (encharcamiento), aunque algunos se forman a partir de restos orgánicos procedentes de vegetación de bosques o de musgos. Estos suelos se clasifican como Histosoles si no tienen permafrost y está dominado por materiales orgánicos. Un uso sostenible que se les da a las zonas turbosas está limitado a formaciones boscosas.

2.1.7. Inceptisoles.

Son aquellos suelos que están empezando a mostrar el desarrollo de sus horizontes puesto que los suelos son bastante jóvenes y todavía en evolución. Incluyen una amplia variedad de suelos, en algunas zonas son suelos con un mínimo desarrollo del perfil.

Uno de los factores de formación más importantes es el tiempo puesto que se necesita el paso de éste para que los suelos se desarrollen. El clima es otro de los

factores de influencia, destacando el hecho de que los Inceptisoles se desarrollan en cualquier tipo de clima excepto en zonas con condiciones áridicas. El régimen de humedad del suelo puede ser variable, desde suelos pésimamente drenados hasta suelos muy bien drenados en pendientes abruptas. En su gran mayoría tienen un aprovechamiento forestal, pero también son suelos de praderas o tierras de cultivo, si se los aplica para pastos siempre y cuando la humedad no falte; cuando se localizan en pendientes un aprovechamiento idóneo es para bosques.

2.1.8. Molisoles.

Los Molisoles son suelos de color oscuro, rico en materia orgánica que se han desarrollado a partir de sedimentos minerales en climas templado húmedo a semiárido; aunque también se presentan en regímenes fríos y cálidos. Tienen una estructura granular que facilita el movimiento del agua y el aire, presentan una dominancia del catión calcio, que favorece la fluctuación de los coloides. En estos suelos se obtienen rendimientos muy altos sin utilizar gran cantidad de fertilizantes.

Son generalmente suelos minerales típicos de las estepas que tienen un horizonte superficial muy oscuro, coloreado y rico en bases; su vegetación típica es de pradera y se desarrollan en una gran variedad de climas cuyos regímenes de humedad varían. Presentan una vegetación de pastizal aunque también se les encuentra bajo vegetación forestal, en cuanto a los cultivos su aprovechamiento más frecuente en el mundo es para maíz, caña de azúcar, soja y algodón.

2.1.9. Oxisoles.

Son suelos minerales de las zonas tropicales cálidas – húmedas, que han pasado por intensos procesos de meteorización y prolongados periodos de lavado. Desembocando en la formación de suelos maduros, de color rojo o amarillo debido a las altas concentraciones de hierro y aluminio. Se desarrollan bajo condiciones climáticas en las que la precipitación es mucho mayor que la evapotranspiración; esto posibilita el

lavado de los productos meteorizables hacia el interior del perfil del suelo; son suelos en los que predominan los óxidos de hierro, aluminio y la caolinita, de baja capacidad de intercambio catiónico.

La mayor parte de los Oxisoles están dedicados a ganadería extensiva o a cultivos itinerantes, a pesar de tener muchos de ellos excelentes propiedades físicas y adecuada topografía; presentan severas limitaciones para fines agropecuarios como consecuencia del excesivo lavado de nutrientes del suelo y del alto riesgo de procesos de erosión irreversible; por todo ello se mantienen como reservas o zonas forestales.

2.1.10. Spodosoles.

Son suelos que presentan una mezcla de materia orgánica y compuestos férrico – alumínicos; poseen una mezcla de materia orgánica y aluminio, con presencia o no de hierro. No presentan arcillas silicatadas y su textura por lo tanto se encuadra en clases desde arenosa, franca o limosa. Se presentan en regímenes de humedad údicos, es decir se desarrollan sobre ambientes húmedos, en general por su naturaleza son poco fértiles y se usan para aprovechamientos forestales, pastizales además de usarse para la silvicultura, el pasto y el heno.

2.1.11. Ultisoles.

Son suelos intensamente meteorizados, con colores más rojizos; se caracterizan por tener un horizonte argílico (arcilla) o kándico (horizonte de textura más gruesa) (GISBERT, Juan; *et al.*, 2006) , con una baja saturación de bases. Aparecen en cualquier régimen de temperatura y humedad, excepto en el arídico. Están en zonas de clima templado con elevadas precipitaciones que produzcan un lavado intenso de las bases.

El clima es uno de los factores más importantes, puesto que la precipitación favorece la translocación del material de una parte del perfil a zonas inferiores y

manteniendo el porcentaje de saturación de bases (PSB) en sus niveles adecuados para pertenecer a este orden. Así pues la Precipitación tiene que ser mucho mayor a la Evapotranspiración. Al ser suelos ácidos, no todos los cultivos pueden desarrollarse sobre éstos; no obstante si se regeneran estos suelos pueden emplearse para el cultivo de ciertas especies, como fuente de recursos forestales (bosques de coníferas).

2.1.12. Vertisoles.

Su nombre deriva del latín y significa verter o revolver, haciendo alusión al efecto de batido y mezcla de arcillas; son suelos en donde hay un alto contenido de arcilla expansiva que durante la estación seca, forma grietas profundas, con coloraciones que oscilan del gris rojizo al negro, dependiendo del material parental. El material parental lo constituyen sedimentos con una elevada proporción de arcillas, o productos de alteración de rocas que las generen, siendo suelos minerales caracterizados por su elevado contenido de arcillas hinchables.

Son suelos muy compactos en la estación seca y muy plásticos en la húmeda, por lo que el manejo de estos suelos es bastante complicado; el factor formador que más influye en su desarrollo es el clima. Estos presentan generalmente una vegetación herbácea bastante desarrollada, aunque su manejo es complicado debido a los movimientos del suelo, se usa generalmente para pastos.

2.2. CLASIFICACIÓN DE ACUERDO A DIFERENCIAS ENTRE SUELOS.

De acuerdo a las características propias del suelo se puede incluir otra clasificación, la misma que diferencia a los tipos de suelo de acuerdo a las diferencias entre ellos¹², en esta clasificación existen algunos suelos que también están contemplados en las otras clasificaciones (FAO, Base referencial mundial del recurso suelo, 2006).

¹² FAO, Base referencial mundial del recurso suelo, un marco conceptual para clasificación correlación y comunicación internacional, 2007, <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/011/a0510s/a0510s00.pdf>

2.2.1. Litosoles.

Son suelos poco desarrollados y muy superficiales; que aparecen en laderas, barrancos, lomas y algunos terrenos planos, por lo que se dice que son de relieves montañosos. Se los conoce también como leptosoles, que viene del griego “leptos” que significa delgado.

2.2.2. Cambisoles.

Abarcan una amplia gama de suelos, se caracterizan por tener algunos minerales como óxidos o arcillas, son de textura franco arenosa sin embargo carecen de los horizontes típicos de suelos bien desarrollados. Dependiendo del contenido de materia orgánica y del pH muchos de ellos serán o no fértiles; son suelos jóvenes con proceso inicial de acumulación de arcilla. Se divide en vértigos, gleycos, eutrícos y crómicos.

2.2.3. Luvisoles.

Es un tipo de suelo que se desarrolla dentro de las zonas con suaves pendientes o llanuras, en climas en los que existen estaciones secas y húmedas bien definidas. Este término deriva de un vocablo “lure” que significa lavar, refiriéndose al lavado de arcilla de las capas superiores, para acumularse en las capas inferiores, donde frecuentemente se denota un claro enrojecimiento por la acumulación de óxidos de hierro.

Son de fertilidad media, presentan buen drenaje y fácil manejo. Poco a poco estos suelos se han incorporado a la agricultura y ganadería; presentan alta susceptibilidad a la erosión.

2.2.4. Acrisoles.

Se desarrollan principalmente sobre productos de alteración de rocas ácidas, con elevados niveles de arcillas muy alteradas. El término Acrisol deriva del vocablo “acris” que significa muy ácido¹³. Su pobreza en nutrientes minerales, la toxicidad por aluminio, la fuerte adsorción de fosfatos y la alta susceptibilidad a la erosión, son las principales restricciones de su uso.

No son muy productivos salvo para especies de baja demanda y tolerantes a la acidez como la piña, caucho o palma (FAO-Unesco, 1990).

2.2.5. Fluvisoles.

Son suelos poco desarrollados, profundos y jóvenes, que poseen horizontes con límites claros, variación de colores y texturas diferentes. El termino fluvisol deriva del vocablo latino “fluvius”, que significa río, haciendo alusión a que estos suelos están desarrollados sobre depósitos aluviales.

Los Fluvisoles pueden estar inundados por períodos muy variables de tiempo, ya que durante el verano se secan hasta considerable profundidad. El régimen de descarga de los ríos es de gran importancia en el proceso de su formación, ya que determina el volumen y granulometría de los sedimentos transportados y depositados. Por lo general están cubiertos por una vegetación forestal densa¹⁴.

¹³ FAO-UNESCO, Mapa mundial de suelos, 1990, <http://books.google.com.ec/books?id=IKwS2b81UIQC&pg=PA42&lpg=PA42&dq=Gleysoles:&source=bl&ots=hmMyiJKnOn&sig=0IHVduZYx7j69C94qZn41bva9zA&hl=es&sa=X&ei=8q9zUovPHfTfsATrg4HgBQ&ved=0CGgQ6AEwDg#v=onepage&q=Gleysoles%3A&f=false>

¹⁴ INEGI, Guía para la interpretación de cartografía edafológica, 2003, http://www.inegi.org.mx/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/geografia/publicaciones/guias-carto/edafo/EdafIII.pdf

2.2.6. Vertisoles.

Son suelos formados de materiales sedimentarios compuestos por arcillas expandibles, que se tornan muy plásticos y pegajosos cuando están húmedos. Mientras que muy duros cuando se secan, lo que da lugar a cuarteaduras y fisuras de profundidades variables. Son suelos arcillosos ligeramente inclinados, moderadamente profundos y con horizontes superficiales de color pardo oscuro.

Su utilización agrícola es muy extensa, variada y productiva, son generalmente muy fértiles, pero presentan problemas en su manejo debido a su dureza, y con frecuencia ocasionan problemas de inundación y drenaje. Son muy adecuados para la actividad pecuaria. Presentan una baja susceptibilidad a la erosión¹⁵.

2.3. FUNCIONES DEL SUELO.

2.3.1. Funciones naturales.

- Hábitat y soporte biológico.
- Componente del ciclo natural.
- Reserva genética.
- Elemento filtrante, amortiguador y de transformación.
- Actúa como filtro regulador durante la descarga de acuíferos y protección de éstos.
- Constituye un hábitat biológico y reserva para la preservación de especies.

¹⁵ Secretaría de medio ambiente y recursos naturales, El Suelo, 2007, http://srnymadgo.gob.mx/medio_ambiente/sitio/ordenamiento_ecologico/bitacora/Contenido%20Pagina%20Web/Bases%20Tecnicas/Bases%20tecnicas_Informes%20del%20estudio%20tecnico/Fase%20de%20Caracterizacion%20I%20Medio%20Natural/Suelo.pdf

- Es el lugar donde se llevan a cabo los ciclos biológicos, biogeoquímicos y de la red trófica.

2.3.2. Funciones de uso.

- Se encuentran yacimientos de materias primas no renovables.
- Fuente de materias primas renovables.
- Archivo histórico.
- Es un medio para la producción de alimentos agrícolas y pecuarios.
- Es la base física para la construcción de edificaciones y servicios.
- Productor de recursos forestales (USÓN, Asunción; *et al.*, 2010).

3. CONTAMINACIÓN DEL SUELO.

La contaminación de los suelos, consiste en la acumulación de sustancias a unos niveles tales que repercuten negativamente en el comportamiento de los mismos. Las sustancias, a esos niveles de concentración, se vuelven tóxicas para los diversos organismos que viven e interactúan en el suelo (RUDA, Ester; *et al.*, 2004).

- La FAO define la contaminación como una forma de degradación química que provoca la pérdida parcial o total de la productividad del suelo.
- El diccionario de la Real Academia define la contaminación como la alteración de la pureza de algún elemento, como los alimentos, el agua, el aire, suelo, etc.

La acumulación de sustancias tóxicas para los organismos suele producirse de una manera artificial, como consecuencia de las actividades humanas, pero también puede ocurrir de manera natural. La edafización¹⁶ libera sustancias contenidas en las

¹⁶ Edafización: Procesos de intemperismo y erosión mediante los cuales las rocas o sedimentos se convierten en suelo.

rocas (heredadas o neoformadas) que se concentran en el suelo alcanzando niveles tóxicos.

3.1. CONTAMINACIÓN POR HIDROCARBUROS.

La contaminación de suelos por hidrocarburos ha cobrado una importancia tal, que se requiere remediarlos a niveles aceptables, enmarcados dentro de límites permisibles en las diversas normativas vigentes en cada país. Para esto, es necesario conocer el grado de afección del suelo, saber si interfieren en la determinación de parámetros como la textura, la materia orgánica, la densidad real y la porosidad (FERNÁNDEZ, Luis; *et al.*, 2006).

Durante muchos años, se cuestionó el efecto tóxico de los hidrocarburos del petróleo en el suelo y en algunas plantas. De tal manera que algunos científicos consideran benéfica la presencia de éstos compuestos, cuando la concentración es baja (MARTÍNEZ, Víctor y LÓPEZ, Felipe, 2001)¹⁷.

Los suelos contaminados con gas natural o crudo muestran incrementos en materia orgánica, carbono total y nitrógeno comparado con suelos normales. Se han determinado efectos de los hidrocarburos en algunas propiedades mecánicas del suelo como la cohesión. Simultáneamente a los efectos en las propiedades físicas y químicas del suelo, suceden cambios en las condiciones de fertilidad, donde se observaron incrementos en nitrógeno y contenido de materia orgánica.

Por otra parte, cuando se realiza un estudio de evaluación o de caracterización de un sitio contaminado con hidrocarburos, se determinan diversos parámetros físicos, químicos y biológicos (FERRERA, Ronald; *et al.*, 2006). Pero no se considera que se hayan afectado de alguna forma, de tal manera que el resultado que se obtiene se considera aceptable. Sin embargo, el valor real puede estar modificado de acuerdo con el

¹⁷ MARTÍNEZ Víctor, LÓPEZ Felipe, Efecto de hidrocarburos en las propiedades físicas y químicas de suelo arcilloso, 2001, <http://www.redalyc.org/pdf/573/57319102.pdf>

tiempo, tipo y cantidad de hidrocarburo que se haya derramado sobre un suelo específico así como a sus propiedades.

Un factor determinante en los posibles efectos por hidrocarburos, es la textura del suelo, es decir, por la presencia proporcional de partículas como arenas, limos o arcillas. Ya que los hidrocarburos en el suelo impiden el intercambio gaseoso con la atmósfera, iniciando una serie de procesos físico-químicos simultáneos como evaporación y penetración, que dependiendo del tipo de hidrocarburo, temperatura, humedad, textura del suelo y cantidad vertida puede ser más o menos lenta. Ocasionando una mayor toxicidad, además de tener una moderada, alta o extrema salinidad, dificultando su tratamiento.

Altos gradientes de salinidad pueden destruir la estructura terciaria de las proteínas, desnaturalizar enzimas y deshidratar células, lo cual es letal para muchos microorganismos usados para el tratamiento de aguas y suelos contaminados. La toxicidad afecta significativamente las características del tipo de suelo, aquellos suelos con mayor capacidad de intercambio, materia orgánica o contenido de arcilla, exhiben mayor adsorción del hidrocarburo, y habrá menor efecto tóxico sobre el ecosistema y las comunidades que lo habitan (MCBRIDE, 1994) (DORN, P; *et al.*, 1998).

Los suelos con mayor contenido de materia orgánica y textura arcillosa pueden adsorber los hidrocarburos, reduciendo su solubilidad y presión de vapor efectivas, debido al reparto entre las fases lipofílicas. De esta manera, disminuye su biodisponibilidad y movilidad (EIBES, G; *et al.*, 2006). Lo que se traduce en una menor toxicidad e impacto al sistema; en suelos de textura arenosa, los hidrocarburos no son fácilmente retenidos, aún en presencia de materia orgánica, por lo que el efecto tóxico es más marcado (LABUD, V; *et al.*, 2007).



Ilustración 8. Suelo con hidrocarburos, 2011.

Fuente los autores.

3.2. EFECTOS EN EL MEDIO AMBIENTE DE SUELOS CONTAMINADOS.

3.2.1. Efectos de la contaminación.

La contaminación del suelo representa una serie de consecuencias y efectos nocivos tanto para el hombre, flora, fauna y demás recursos que se encuentren en contacto con el suelo contaminado. La amplia variedad de repercusiones toxicológicas, depende en gran medida de cada sustancia con la que se ha degradado la salud del suelo. Las primeras consecuencias repercuten en la vegetación, las plantas se degradan y se reduce considerablemente la variedad de especies. Las que aun sobrevivan presentarán aspectos débiles y su proceso natural se dará con dificultad. De esta misma absorción de contaminantes a la flora las consecuencias se extienden a la fauna que la consume.

Los daños que puede sufrir el hombre bien pueden ser entonces en base a la ingestión o al contacto dérmico con estas sustancias, pudiendo provocar casos de intoxicaciones por metales pesados, por ejemplo.

Un suelo contaminado dificulta el desarrollo de la vida de la fauna, sin existir alimento ni agua limpia, las especies migran o sufren daños irremediables en su cadena de procreación. Con este proceso se sufre entonces lo que se llama “degradación paisajística” y por ende una “perdida en el valor del suelo”, las actividades agropecuarias se detienen, la fauna desaparece y la tierra queda inútil o muy alterada.

3.2.2. Degradación.

Según la FAO – UNESCO, la degradación es el proceso que rebaja la capacidad actual y potencial del suelo para producir, cuantitativa y cualitativamente, bienes y servicios.

La degradación del suelo es la consecuencia directa de la utilización del suelo por el hombre, bien como resultado de actuaciones directas, como agrícola, forestal, ganadera, uso de agroquímicos y riego; o por acciones indirectas, como son las actividades industriales, eliminación de residuos, transporte, etc.

Degradación de la fertilidad, es la disminución de la capacidad del suelo para soportar vida, en la cual se producen modificaciones en sus propiedades físicas, químicas, fisicoquímicas y biológicas que conllevan a su deterioro.

Al degradarse el suelo pierde capacidad de producción y cada vez hay que añadirle más cantidad de abonos, para producir siempre cosechas muy inferiores a las que produciría el suelo si no estuviese degradado.

Puede tratarse de una degradación química, que se puede deber a varias causas:

- Pérdida de nutrientes.
- Acidificación.
- Salinización.
- Sodificación.
- Aumento de toxicidad por liberación o concentración de elementos químicos.

El deterioro del suelo a veces es consecuencia de una degradación física, por:

- Pérdida de estructura.
- Aumento de la densidad aparente.
- Disminución de la permeabilidad.
- Disminución de la capacidad de retención de agua.

En otras ocasiones se habla de degradación biológica, cuando se produce una disminución de la materia orgánica que deja como consecuencia un suelo pobre en nutrientes.

3.2.2.1. Efectos de la degradación.

La degradación tiene importantes consecuencias, entre las más importantes tenemos.

- Pérdida de elementos nutrientes (N, P, S, K, Ca, Mg). Puede ser de manera directa, bien al ser eliminados por las aguas que se infiltran en el suelo o bien por erosión, a través de las aguas de escorrentía. O de una forma indirecta, por erosión de los materiales que los contienen o que podrían fijarlos.
- Modificación de las propiedades fisicoquímicas; acidificación, desbasificación y bloqueo de los oligoelementos que quedan en posición no disponible.
- Deterioro de la estructura, la compactación del suelo produce una disminución de la porosidad, que origina una reducción del drenaje y una pérdida de la estabilidad.
- Disminución de la capacidad de retención de agua: por degradación de la estructura o por pérdida de suelo.

- Pérdida física de materiales: erosión selectiva (parcial, de los constituyentes más lábiles, como los limos) o masiva (pérdida de la capa superficial del suelo, o en los casos extremos de la totalidad del suelo).
- Incremento de la toxicidad. Al modificarse las propiedades del suelo se produce una liberación de sustancias nocivas¹⁸.

En definitiva, se produce un empeoramiento de las propiedades del suelo y una disminución de su masa. Estos efectos tienen dos consecuencias generales: a corto plazo, disminución de la producción y aumento de los gastos de explotación (cada vez el suelo necesita mayor cantidad de abonos y cada vez produce menos). A largo plazo: infertilidad total, abandono, desertización del territorio (GARCÍA, Inés y DORRONSORO, Carlos., 2001).

4. BIORREMEDIACIÓN DE HIDROCARBUROS.

Que es la biorremediación: “Es el proceso de limpieza del medio ambiente contaminado con elementos químicos utilizando organismos vivos que degraden materiales peligrosos en sustancias menos tóxicas (THIEMAN, William y PALLADINO Michael., 2010).

4.1. Reseña.

Cuando se empezó a actuar sobre los espacios contaminados a inicios de los años 1980, el método solía consistir en retirar los residuos y/o suelo contaminado a un vertedero o cubrirlos con una capa impermeable, en el mejor de los casos, para así destinarlos a su confinamiento. Más tarde, se planteó la necesidad de desarrollar alternativas para solucionar de forma más permanente y menos costosa el problema de

¹⁸ GARCÍA Inés, DORRONSORO Carlos, Contaminación del suelo, 2000, <http://www.ciefa.org/acrobat/modulos/LECTURA%20TRES%20%20MODULO%20DOS%20GAOT.pdf>

los espacios contaminados. Como consecuencia, desembocó en el desarrollo y uso de tecnologías más apropiadas para el tratamiento de suelos contaminados, por lo que en la actualidad es un tema de gran interés por sus repercusiones económicas y sociales.

La rápida expansión y la sofisticación creciente de diferentes sectores industriales, han desencadenado un incremento de la cantidad y la complejidad de residuos tóxicos generados, a partir de los diversos procesos industriales presentes ahora en nuestro medio. Al mismo tiempo, por otra parte, se ha ido generando conciencia social y ambiental, de este tipo de peligros que lentamente van forzando al establecimiento de una rigurosa legislación, para reducir la producción de ciertos residuos contaminantes que ya han sido identificados como peligrosos para la salud y bienestar de un sin número de personas y el ambiente.

Algunos accidentes que han supuesto un elevado impacto ambiental, con repercusiones inmediatas sobre los diversos ecosistemas, entre los cuales podemos citar: El vertido de combustible del Exxon Valdez, la liberación de productos radiactivos tras el accidente de la central nuclear de Chernóbil. Para nombrar un caso en nuestra sociedad podemos hablar acerca de los pasivos ambientales dejados por la compañía petrolera Estadounidense Chevron en la Amazonia Ecuatoriana. Todo esto y demás malas prácticas, han puesto de manifiesto la justificada preocupación y alarma que estos temas suscitan en la población nacional y mundial. Además preocupa lo mucho que queda por hacer para prevenir o resolver adecuadamente ese tipo de complicaciones.

Entre las posibles técnicas de tratamiento aplicables para la descontaminación de un determinado recurso, tienen una bien ganada reputación, los procesos de degradación biológica. Ya que son útiles para muchos tipos de residuos que pueden ser de procedencia minera, petrolera, industrial, etc. Sus principales características se basan en que son procesos naturales, que no suponen un impacto adicional sobre los ecosistemas y que se pueden realizar a un bajo costo, aplicando medidas necesarias según sea el caso y la procedencia del elemento a tratar.

En muchos casos, pueden llevarse a cabo en el sitio donde se ha producido la contaminación (in-situ), o ser enviados a otros lugares (ex-situ) para aplicarles un tratamiento de descontaminación. Los tratamientos de biodescontaminación se basan en la acción de microorganismos o plantas sobre los productos contaminantes (MARTÍN, Carmen; *et al.*, 2004).

El resultado final de un tratamiento de biodegradación depende en gran medida de la toxicidad, la concentración inicial de los contaminantes, su biodegradabilidad, las propiedades del emplazamiento contaminado y el sistema de tratamiento seleccionado. Los contaminantes tratados habitualmente por estos métodos son los compuestos orgánicos volátiles derivados del petróleo, que en este caso fueron objeto de nuestro estudio.

4.1.1. Historia.

La biorremediación es un concepto que nació en los años 80 producto del conocimiento empírico de los operadores de las refinerías de petróleo, pues la biorremediación fue usada durante muchos años por la industria petrolera de los EE.UU. Posteriormente fue entendida de una manera científica cuando investigadores y técnicos de las industrias llegaron a determinar que algunos microorganismos, sobre todo algunas bacterias, podían utilizar los hidrocarburos del petróleo como alimento y fuente de energía. Es así como algunos estudios demostraron que estos microorganismos eran los principales responsables de la descomposición de aceites en el suelo de los campos de exploración, por consiguiente, se buscó determinar las condiciones óptimas para reproducir estas condiciones en el campo, y así acelerar el proceso (DI PAOLA, María y VICIÉN, Carmen., 2010).

Según la Oficina de Evaluación de Tecnologías del Congreso de los EEUU (U.S. Congress, Office of Technology Assessment), la biorremediación es el acto de incorporar, a sitios contaminados, organismos que permitan la aceleración del proceso

natural de degradación de sustancias tóxicas, lo cual permite transformar dichos compuestos en otros químicamente distintos e inoos.

Actualmente la biorremediación es una técnica que utiliza estrategias físico-químicas para contrarrestar la contaminación causada por varios elementos tóxicos entre los más comunes los hidrocarburos y sus derivados. Las técnicas que se usan son muy diversas y dependen principalmente de varias características propias del sitio contaminado, como puede ser el tipo de contaminante, el medio contaminado, el área contaminada, etc.

Así, la forma de realizar la técnica puede variar dependiendo si se la realiza in situ o ex situ; la primera se refiere a tratar el material contaminado en el sitio mismo en que se produjo el problema, la segunda a diferencia de esta realiza el tratamiento de biorremediación en otro lugar, es decir se transporta el material contaminado a otro lado, para que pueda ser tratado; cabe recalcar que esto depende de la facilidad o no de transportar el material además del costo que esto implicaría.

Esta técnica permite entonces tratar grandes volúmenes de contaminantes con un impacto ambiental mínimo, a diferencia de otros procedimientos de descontaminación. Su peculiaridad es que algunos de los microorganismos son capaces de degradar los compuestos contaminantes en sustancias como dióxido de carbono, sales, agua y otros productos inoos para el medio ambiente (Advanced Biotech, 2000). Los cuales se integran posteriormente a los ciclos biogeoquímicos naturales.

Por otro lado, la respuesta de microorganismos del suelo ante la presencia de hidrocarburos está relacionada con la estructura química de estos compuestos.

4.2. TÉCNICAS DE BIORREMEDIACIÓN.

El proceso de biorremediación se clasifica en tres técnicas bien definidas, las mismas que se diferencian entre sí por sus características principales. Se les puede

clasificar entonces según: el organismo que se emplea, la técnica que se utiliza o según el lugar en el que se realiza la técnica.

4.2.1. Según organismo empleado.

4.2.1.1. Degradación enzimática.

Este tipo de degradación consiste en el empleo de enzimas en el sitio contaminado, con el fin de degradar las sustancias nocivas. Estas enzimas se obtienen en cantidades industriales a partir de bacterias que las producen naturalmente, o por bacterias modificadas genéticamente que son comercializadas por las empresas biotecnológicas.

La descontaminación se logra gracias a la capacidad natural de los organismos antes mencionados, de transformar moléculas orgánicas en sustancias más pequeñas, que resultan menos tóxicas.

4.2.1.2. Remediación microbiana.

Se refiere al uso de microorganismos directamente en el foco de la contaminación. Estos microorganismos pueden existir en ese sitio o provenir de otros ecosistemas, en cuyo caso deben ser inoculados en el sitio contaminado. Cuando no es necesaria la inoculación de microorganismos, suelen administrarse nutrientes, como nitrógeno, con el fin de acelerar el proceso de degradación.

4.2.1.3. Fitorremediación.

La fitorremediación es el uso de plantas para limpiar ambientes contaminados y constituye una estrategia muy interesante, debido a la capacidad que tienen algunas

especies vegetales de absorber, acumular y/o tolerar altas concentraciones de contaminantes como metales pesados, compuestos orgánicos y radioactivos, etc. (THIEMAN, William y PALLADINO Michael., 2010). Las ventajas que ofrece la fitorremediación frente a los procesos descritos anteriormente son, el bajo costo y la rapidez con que pueden llevarse a cabo ciertos procesos degradativos.

Según la planta y el agente contaminante, la fitorremediación puede producirse por acumulación del contaminante en las partes aéreas de la planta; absorción, precipitación y concentración del contaminante en raíces. Reducción de la movilidad del contaminante para impedir la contaminación de aguas subterráneas o del aire; desarrollo de bacterias, hongos que crecen en las raíces y degradan contaminantes (este es el caso de mayor utilización para la limpieza de contaminación mediante hidrocarburos); captación y modificación del contaminante para luego liberarlo a la atmósfera con la transpiración y degradación del contaminante para originar compuestos menos tóxicos.

TIPO.	PROCESO INVOLUCRADO.
Fitoextracción.	Las plantas se usan para concentrar metales en las partes que se cosechan (hojas y raíces).
Rizofiltración.	Las raíces de las plantas se usan para absorber, precipitar y concentrar metales pesados, a partir de efluentes líquidos contaminados y degradar compuestos orgánicos.
Fitoestabilización.	Las plantas tolerantes a metales se usan para reducir la movilidad de los mismos y evitar el paso a napas subterráneas o al aire.
Fitoestimulación.	Se usan los exudados radiculares para promover el desarrollo de microorganismos degradadores (bacterias y hongos).
Fitovolatilización.	Las plantas captan y modifican metales pesados o compuestos orgánicos y los liberan a la atmósfera con la transpiración.
Fitodegradación.	Las plantas acuáticas y terrestres captan, almacenan y degradan compuestos orgánicos para dar subproductos menos tóxicos o no tóxicos.

Tabla 3. Tipos de Fitorremediación, 2010.

Fuente María Marta Di Paola y Carmen Vicién, Argentina.

Cuando se plantea realizar un esquema de Fitorremediación, se siembra el vegetal con capacidad de extraer el contaminante y luego de un período de tiempo determinado, se cosecha la biomasa y se procede a su disposición final, mediante un procedimiento que dependerá del contaminante en cuestión. De esta forma, se evita que los contaminantes acumulados en las plantas se transmitan a través de la cadena alimentaria a otros organismos.

La biotecnología aplicada a la fitorremediación es incipiente. Su aplicación a gran escala está confrontada con la evaluación de riesgos relativos a la transferencia de genes de las bacterias a plantas, que luego serán consumidas por animales herbívoros que pueden tener la propiedad de acumular los metales o componentes tóxicos.

4.3. SEGÚN LA TÉCNICA UTILIZADA.

4.3.1. Bioaumentación.

La bioaumentación es la práctica de incrementar la población de bacterias nativas de un ecosistema, con la adición de bacterias adaptadas selectivamente, las cuales han sido desarrolladas para aumentar los rangos de reducción orgánica o proporcionar la habilidad de degradar compuestos, previamente considerados como difíciles o no biodegradables (OMI, 2005).

Dicha técnica no sustituye la población de bacterias existentes, pero aumenta su habilidad de responder a ciertas situaciones o degradar compuestos de la corriente de desechos, dando como resultado una mejora del tratamiento¹⁹.

La bioaumentación posibilita controlar la naturaleza de la biomasa, garantiza que el tipo de microorganismos más idóneo esté presente en el suelo en cantidad suficiente para degradar en forma efectiva y eficiente los residuos contaminantes mientras se los reduce a sus componentes básicos (dióxido de carbono y agua).

4.3.2. Bioestimulación.

Esta técnica pretende modificar las condiciones del suelo (nutrientes, aireación, pH, humedad, entre otros) para que la actividad degradativa de interés, pueda desarrollarse en condiciones óptimas. De tal forma puede lograrse, por ejemplo, que el crecimiento endógeno de los degradadores de petróleo sea estimulado por la adición de nutrientes u otros sustratos.

¹⁹ OMI, Manual sobre la contaminación ocasionada por hidrocarburos, 2005, <http://books.google.es/books?id=8YlQn3DzQXIC&pg=PA167&dq=bioestimulacion&hl=es&sa=X&ei=JKCKUvqlM43rkQeYzoHIBw&ved=0CDIQ6AEwAA#v=onepage&q=bioestimulacion&f=false>

4.3.3. Inoculación.

Este método es una forma de tratamiento in situ (en el lugar) y se refiere a tratar el suelo contaminado sin removerlo (excavarlo). En este caso los minerales, nutrientes y a menudo los organismos son agregados dentro del piso a través de pozos, galerías de infiltración u otras formas, que facilitan que el proceso de degradación se realice en el sitio donde está la contaminación.

4.3.4. Land farming (cultivo de la tierra).

La técnica consiste básicamente en la adición de fertilizantes con nitrógeno y fósforo (en cantidades proporcionales al carbono presente en el vertido), la aireación periódica del suelo, y el mantenimiento de niveles de pH y humedad óptimos para la actividad microbiana. La mezcla periódica y la adición de más nutrientes (y/o organismos) permite asegurar homogeneidad mientras se airea la tierra. Esta práctica se conoce a menudo como cultivo de la tierra, pues los microorganismos son susceptibles de ser “cultivados”, para facilitar la degradación de material contaminado.

“El objetivo principal de este método es recoger el lixiviado para que el agua contaminada no pueda seguir contaminando el medio ambiente”. (THIEMAN, William y PALLADINO Michael., 2010).

El tratamiento también se puede realizar ex situ (fuera del lugar) y se refiere a la excavación del lugar y el tratamiento de la tierra en un área apartada donde se agregan nutrientes minerales y microorganismos externos (si es el caso), seguido de una buena mezcla para asegurar la distribución a través de toda la tierra.



Ilustración 9. Área de Land farming - Shushufindi, 2011.

Fuente los autores.

4.3.5. Biopilas.

“Las Biopilas de suelo se utilizan cuando se sabe que las sustancias químicas del terreno se evaporan fácilmente y cuando los microbios de los montones de tierra degradan rápidamente los contaminantes” (THIEMAN, William y PALLADINO Michael., 2010).

La técnica de Biopilas se basa en colocar la tierra dentro de celdas de tratamiento, usando una red de tubos perforados que permiten que el aire fresco se mueva a través del material, mediante el empleo de un compresor. Esta técnica requiere menos equipo y en la mayoría de casos un área menor de tratamiento.

Recientemente dentro de esta técnica se ha incorporado el compostaje, que consiste en mezclar los sedimentos contaminados con enmiendas orgánicas fácilmente degradables, y mantener la mezcla en montones o pilas bajo condiciones controladas de humedad y aireación. Durante la degradación aeróbica de esos materiales orgánicos, que va acompañada de la producción de calor (alcanzándose temperaturas de 45°C), se desarrollan comunidades microbianas capaces de degradar diversas sustancias tóxicas

presentes en el suelo. Esta técnica ya se ha utilizado para la biorremediación de explosivos, clorofenoles, hidrocarburos y pesticidas (SEBITO, 2004).



Ilustración 10. Biopilas – Shushufindi, 2011.

Fuente los autores.

4.3.6. Biofiltros.

Los biofiltros suelen consistir en recipientes (biorreactores) en los que los microorganismos se mantienen confinados, en medio líquido o sobre soportes sólidos. Los microorganismos se seleccionan por su capacidad para degradar o retener de forma específica los compuestos que se pretende eliminar. El medio contaminado, acuoso o gaseoso, se hace pasar por el biofiltro, obteniéndose un efluente con menor contenido del compuesto contaminante. Este efluente puede someterse a nuevas rondas de filtrado hasta la eliminación del contaminante. También es posible diseñar biofiltros para la inmovilización de contaminantes, que no se pueden degradar, como los metales (cadmio, mercurio, o uranio).

Como en los biofiltros los microorganismos se mantienen confinados y no se liberan al ambiente, puede constituir una estrategia para el empleo de organismos que han sido genéticamente modificados para mejorar sus propiedades degradativas.



Ilustración 11. Biofiltros, 2006.

Fuente <http://pmadesinaloa.com.mx/detalle.php?id=83>

4.4. SEGÚN EL LUGAR DE REALIZACIÓN.

4.4.1. In situ.

En el tratamiento in situ (también conocido como biorremediación intrínseca) se puede estimular la actividad degradativa de los organismos que están presentes en el lugar contaminado, a través del suministro de nutrientes (bioestimulación).

También es posible añadir organismos con propiedades específicas para degradar el contaminante (bioaumentación). Este tipo de tratamiento se realiza cuando los contaminantes han llegado, por ejemplo, a las capas freáticas.

4.4.2. Ex situ.

En el tratamiento ex situ, el contaminante es transportado a una planta de procesamiento donde se trata en reactores con microorganismos degradadores

especializados. Cuando el contaminante no se puede biodegradar, como sucede con los metales pesados, la estrategia utilizada es la bioacumulación, es decir, la acumulación del contaminante en el interior del organismo que posteriormente es retirado.

4.5. BIORREMEDIACIÓN DE HAPS.

4.5.1. Estructura de los HAPs.

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) se definen por ser estructuras formadas por 2 o más moléculas de benceno fusionadas. Se conocen unos 100 HAPs diferentes ya que existe una elevada cantidad de isómeros. La estructura atómica del anillo bencénico les confiere una gran estabilidad termodinámica debido a la elevada energía de resonancia negativa que proporciona contener seis orbitales moleculares por solapamiento cíclico. Todos los compuestos con sistemas electrónicos cíclicos son catalogados como aromáticos.

Su fórmula general es C_nH_{2N+6} .

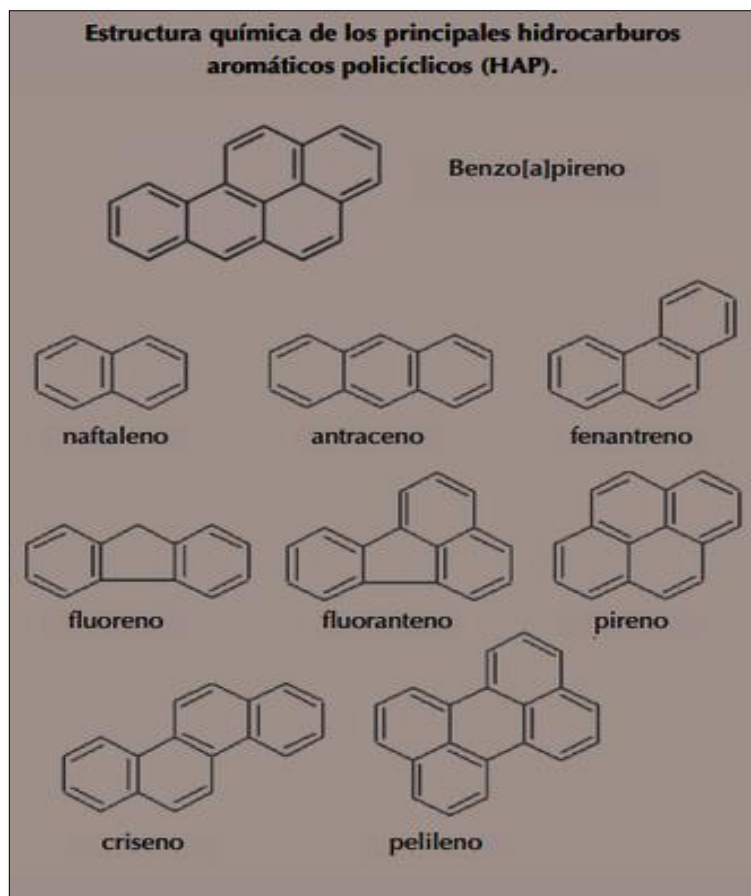


Ilustración 12. Estructura química de HAPs, 2003.

Fuente Carmen Martín Moreno, Aldo Gonzáles Becerra, María José Blanco Santos Madrid-España.

Según la cantidad de anillos bencénicos que disponga el compuesto se los puede clasificar, en hidrocarburos monoaromáticos (un anillo bencénico), diaromáticos (2 anillos bencénicos) y poliaromáticos (con más de dos anillos bencénicos).

- Hidrocarburos monoaromáticos: Se encuentran el benceno y sus alquilados (monoalquilados como el tolueno y dialquilados como los xilenos), formando la familia de los BTEX (benceno, tolueno, etilbenceno y xileno) de gran importancia ambiental debido a su volatilidad y toxicidad.
- Hidrocarburos poliaromáticos: Entre los hidrocarburos diaromáticos, encontramos el naftaleno y sus alquilados (mono, di, tri y tetrametilnaftalenos).

Constituyen la familia mayoritaria de hidrocarburos aromáticos presentes en un crudo.

- Entre los hidrocarburos poliaromáticos de tres anillos, encontramos el fenantreno, antraceno, fluoreno, y sus derivados alquilados. El fenantreno y los metilfenantrenos, representan los componentes mayoritarios de los triaromáticos.
- Entre los hidrocarburos poliaromáticos de más de tres anillos, encontramos el fluoranteno (3 anillos bencénicos y uno no bencénico), pireno y criseno (4 anillos aromáticos), pireno y venzo (a) pireno (5 anillos aromáticos) y coroneno (un HAP pericondensado con 6 anillos). También se pueden incluir compuestos muy relacionados con los hidrocarburos aromáticos que contienen anillos aromáticos heterocíclicos con azufre (tiofenos, dibenzotiofenos) o nitrógeno (carbazoles).

4.5.2. Origen y distribución de los HAPs en el medio ambiente.

El anillo bencénico es una de las estructuras más ampliamente distribuida en la naturaleza. Los HAPs se forman por la exposición de moléculas orgánicas a elevadas temperaturas (pirólisis), así como también por exposiciones a menor temperatura (100-150°C) y a elevadas presiones durante millones de años en sedimentos, durante la formación del petróleo.

Las características más importantes que condicionan el comportamiento de los HAPs en el medio ambiente, van ligadas a las características fisicoquímicas propias de la estructura de cada HAPs (JÍMENEZ, 2001). Son de gran importancia la hidrofobicidad, que aumenta cuanto mayor sea el número de anillos y la volatilidad de los HAPs de menor peso molecular.

Debido a las propiedades hidrofóbicas, los HAPs muestran una fuerte tendencia a adsorberse a las superficies lo que dificulta su biodegradación, así como a acumularse en la cadena trófica.

Los HAPs constan como los contaminantes prioritarios, para su eliminación, esto se debe fundamentalmente a su peligrosidad intrínseca. Debido a su toxicidad aguda y al ser elementos de tipo teratogénico, mutagénico y carcinogénico (DÍAZ, Gilberto; *et al.*, 1994). Asimismo también se bioacumulan y su biodegradación en general es mucho más lenta, especialmente los de elevado peso molecular que la de otros hidrocarburos.

4.5.3. Fuentes de emisión de HAPs.

Los HAPs existentes en el medio ambiente (atmósfera, suelo y ecosistemas acuáticos) pueden proceder tanto de la naturaleza como de la actividad humana (MUÑOZ-AMADOR, Omar; *et al.*, 2001). A continuación las principales fuentes de emisión tanto naturales como antropogénicas.

4.5.3.1. Fuentes naturales:

- Fuegos forestales.
- Producción por seres vivos.
- Filtraciones naturales de petróleo.
- Erupciones volcánicas.

4.5.3.2. Fuentes antropogénicas:

- Combustión de madera y combustibles fósiles.
- Emisiones de vehículos, aviones y embarcaciones.
- Industria del petróleo.
- Prospecciones y extracción.
- Accidentes de transporte.
- Almacenamiento.
- Refinado.
- Aguas de deslastre.
- Residuos.

- Creosota, compuesto químico derivado del fraccionamiento de alquitranes procedentes de la destilación de carbones grasos.
- Utilización de petróleo y derivados.
- Procesos industriales.
- Aguas residuales urbanas e industriales.
- Aguas de escorrentía urbanas y de carreteras.
- Humo de tabaco.
- Incineración de residuos.

4.5.4. Proceso de biodegradación de HAPs.

Los microorganismos juegan un papel importante en la eliminación de los HAPs en los ecosistemas terrestres y acuáticos, siendo la degradación microbiana el principal proceso de descontaminación natural. Por lo tanto es necesario un buen conocimiento y control de este proceso natural para aplicarlo a tecnologías de biorremediación (USEPA, 1999).

Las bacterias inician la oxidación del anillo aromático mediante la incorporación de dos átomos de oxígeno catalizado por una dioxigenasa. A partir de esta reacción se forma un cis-dihidrodiol, a diferencia de los hongos y mamíferos que generan un transdihidrodiol, y el anillo pierde la aromaticidad²⁰.

A continuación una deshidrogenasa NAD + dependiente, reconstituye el anillo aromático formando un catecol (diol). Los dioles son moléculas a partir de las cuales se produce la ruptura del anillo aromático mediante dioxigenasas estereoselectivas. La ruptura se puede dar entre los dos grupos hidroxilos, denominándose orto-ruptura, o adyacente a estos grupos, denominándose meta-ruptura (FERNÁNDEZ, Adrián; *et al.*, 1995).

²⁰ FERNÁNDEZ Adrián, YARTO Mario, CASTRO José, Las sustancias tóxicas persistentes, 2005, <http://books.google.es/books?id=ACHxIiaWTiwC&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=false>

Los contaminantes tratados habitualmente por estos métodos son los compuestos orgánicos volátiles y semivolátiles no halogenados y los derivados del petróleo. Cuando la contaminación incluye altas concentraciones de metales, compuestos orgánicos con alta proporción de cloro o sales inorgánicas, la eficacia del tratamiento se reduce debido a la toxicidad microbiológica de estos compuestos.

Los microorganismos pueden ser modificados para producir principalmente determinadas enzimas que contribuyan a metabolizar los compuestos producidos como consecuencia de la actividad industrial y que son tóxicos para otras formas de vida. Incluso, se pueden diseñar rutas metabólicas alternativas para la biodegradación de residuos complejos.

Los procesos biológicos tienen las ventajas de requerir inversiones de capital moderadas, bajo consumo de energía, ser ambientalmente seguros y no generar residuos. La velocidad de degradación, depende de factores tales como:

- Tipo y población de microorganismos presentes.
- Naturaleza y estructura química del contaminante.
- Condiciones ambientales del sistema a biorremediar (*REYES, Hernández; et al., 2012*).

Algunos microorganismos pueden utilizar derivados del petróleo como fuente de carbono y muchos de ellos producen surfactantes, que pueden emulsionar los aceites en el agua facilitando su eliminación. A diferencia de los surfactantes químicos, los de origen microbiológico son inocuos y biodegradables. También se han utilizado, en ocasiones, fertilizantes para incrementar la tasa de crecimiento de las poblaciones autóctonas capaces de degradar compuestos derivados del petróleo.

4.6. MICROORGANISMOS DEGRADADORES DE HAPS.

La capacidad de degradación de compuestos que contienen anillos aromáticos está ampliamente distribuida en la naturaleza, y de hecho, se han aislado numerosas

especies de bacterias y hongos degradadores de compuestos aromáticos (THIEMAN, William y PALLADINO Michael., 2010). Se han descrito una gran variedad de géneros bacterianos degradadores de HAPs que incluyen:

<i>Achromobacter</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Nocardia</i>
<i>Acidovorax</i>	<i>Comamonas</i>	<i>Paenibacillus</i>
<i>Acinetobacter</i>	<i>Corynebacterium</i>	<i>Porphyrobacter</i>
<i>Aeromonas</i>	<i>Flavobacterium</i>	<i>Pseudomonas</i>
<i>Agrobacterium</i>	<i>Microbacterium</i>	<i>Ralstonia</i>
<i>Alcaligenes</i>	<i>Micrococcus</i>	<i>Rhodococcus</i>
<i>Arthrobacter</i>	<i>Moraxella</i>	<i>Sphingomonas</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Mycobacterium</i>	<i>Streptomyces</i>
<i>Beijerinckia</i>	<i>Neptunomonas</i>	<i>Vibrio y Xanthomonas</i>

Tabla 4. Compilación, Bacterias degradadoras de HAPs, 2013.

Fuente los autores.

Asimismo también se han descrito una gran variedad de géneros de hongos degradadores de HAPs como:

<i>Agrocybe</i>	<i>Marasmiellus</i>	<i>Ramaria</i>
<i>Aspergillus</i>	<i>Marasmius</i>	<i>Rhizoctonia</i>
<i>Candida</i>	<i>Mortierella</i>	<i>Rhodotorula</i>
<i>Crinipellis</i>	<i>Mucor</i>	<i>Saccharomyces</i>
<i>Chrysosporium</i>	<i>Naematoloma</i>	<i>Syncephalastrum</i>
<i>Cunninghamella</i>	<i>Laetiporus</i>	<i>Trametes</i>
<i>Bjerkandera</i>	<i>Phanerochaete</i>	<i>Trichoderma</i>
<i>Fusarium</i>	<i>Pleurotus</i>	
<i>Kuehneromyces</i>	<i>Penicillium</i>	

Tabla 5. Compilación, Hongos degradadores de HAPs, 2013.

Fuente los autores.

Los organismos que se utilizan en la biorremediación pueden dividirse en 2 grupos de acuerdo a si son propios o no del sitio a remediar.

4.6.1. Endógenos.

Los microorganismos denominados endógenos, son aquellos que se encuentran formando parte del ecosistema que se pretende descontaminar. Para estimular el crecimiento de estos microorganismos y forzar la degradación de los contaminantes, puede que sea necesario establecer unas condiciones de temperatura, oxigenación y contenido de nutrientes determinadas.

4.6.2. Exógenos.

Cuando en el ecosistema no esté presente la actividad biológica que se requiere para degradar la contaminación producida, pueden incorporarse microorganismos de otra procedencia cuya eficacia haya sido probada anteriormente. En este caso, se habla de microorganismos exógenos. Cuando esto sucede, hay que asegurarse de que las condiciones de este nuevo emplazamiento permitirán el desarrollo de la microflora incorporada.

4.7. PROCESO DE DEGRADACIÓN BIOLÓGICA.

A la hora de poner en marcha una estrategia de descontaminación biológica, hay una serie de cuestiones que deben ser respondidas para integrar los distintos factores involucrados y elaborar un protocolo jerarquizado de tratamiento.

- En primer lugar, hay que conocer los compuestos contaminantes que están presentes y cuáles de ellos deben ser eliminados.
- Hay que decidir qué tipo de microorganismos van a ser empleados (exógenos o endógenos)
- Hay que diseñar el método que va a permitir evaluar el grado de éxito del tratamiento aplicado.

Es indispensable considerar, desde el principio y durante el desarrollo de todo el proceso, las interacciones entre los aspectos microbiológicos, geológicos, químicos y de ingeniería de procesos (MARTÍN, Carmen; *et al.*, 2004).

Existen otros parámetros muy importantes que se encuentran dentro de los ya mencionados y que deben ser considerados a la hora de elegir un método de remediación biológica, algunos de estos parámetros incluyen:

- La biodegradabilidad.
- La distribución del contaminante en las distintas fases.
- El potencial de lixiviación.
- La reactividad química de los contaminantes.
- El tipo y propiedades del suelo.
- La disponibilidad de oxígeno.
- Por último la presencia o ausencia de sustancias inhibidoras.

A continuación, se enumeran algunas de las consideraciones generales con relación a cualquier proceso de degradación biológica de compuestos derivados del petróleo:

- La biodegradación de todos los hidrocarburos requiere la disponibilidad de aceptores electrónicos: oxígeno, peróxido de hidrógeno, en ecosistemas terrestres, y nitrato o sulfato, en las condiciones anaerobias que prevalecen en los estratos profundos del suelo.
- Muchas bacterias producen surfactantes como respuesta a la presencia de hidrocarburos. Este hecho se ha comprobado tanto en bacterias que degradan alcanos como en las degradadoras de aromáticos policíclicos.
- En algunas ocasiones, aunque no se produzca una biodegradación considerable, se pueden producir biotransformaciones beneficiosas.

- Cuando la contaminación incluye altas concentraciones de metales, compuestos orgánicos con alta proporción de cloro o sales inorgánicas, la eficacia del tratamiento se reduce debido a la toxicidad microbiológica de estos compuestos.
- Los microorganismos pueden ser modificados para producir principalmente determinadas enzimas, que contribuyan a metabolizar los compuestos producidos, como consecuencia de la actividad industrial y que son tóxicos para otras formas de vida.
- Los procesos biológicos tienen la ventaja de requerir inversiones de capital moderadas, bajo consumo de energía, ser ambientalmente seguros y no generar residuos.
- Las condiciones ambientales deben ser óptimas para que los microorganismos se puedan desarrollar adecuadamente y provocar la máxima detoxificación.

En cuanto a las concentraciones de nitrógeno y fósforo asimilables presentes en el suelo, suelen ser limitantes para un incremento y activación de la población microbiana, mientras que otros nutrientes esenciales como el Ca^{2+} , Na^+ , Fe^{2+} y SO_4 ya están presentes en cantidades suficientes en el suelo (GARCÍA, O; *et al.*, 2012).

La adición de fuentes de N y P inorgánicas, generalmente tiene un efecto positivo, incrementando las poblaciones microbianas y las tasas de biodegradación de hidrocarburos en suelos contaminados (CHINEAU, H; *et al.*, 2003).

4.8. APLICACIONES DE LA BIORREMEDIACIÓN.

La biorremediación es una alternativa para la descontaminación de efluentes industriales. Enzimas como las peroxidasas pueden ser utilizadas para el tratamiento de los residuos de origen textil, dada la necesidad de remover los colorantes presentes en ellos. Teniendo en cuenta que son tóxicos para la flora y fauna, afectan la fertilidad del

suelo, impiden la fotosíntesis en los sistemas acuáticos, así mismo los productos de la degradación parcial; son mutagénicos y carcinogénicos poniendo en peligro muchas de las formas de vida (BECERRA, Karla; *et al.*, 2010).

La biorremediación es empleada para minimizar el impacto de los metales pesados sobre el medio, empleando microorganismos, entre ellos *Escherichia coli*, debido a que es una bacteria de fácil manejo. Es ampliamente utilizada y es apta para modificaciones genéticas de cepas comerciales, con el interés de remover y recuperar metales tóxicos de importancia ambiental como el plomo (CONTRERAS, Diana; *et al.*, 2011).

La creciente contaminación industrial y agrícola ha llevado a una mayor necesidad de procesos que eliminen contaminantes específicos tales como compuestos de nitrógeno, fósforo y compuestos clorados. Los nuevos métodos comprenden procesos aeróbicos, anaeróbicos y físico-químicos en filtros de lecho fijo y biorreactores, en los cuales se retienen en suspensión materiales y microorganismos.

Los residuos sólidos domésticos, son un problema importante en nuestra sociedad de consumo, sin embargo, la mayor parte son compuestos orgánicos rápidamente biodegradables. Por lo que si se los utiliza como fuente de bio-residuos bien separados, pueden convertirse en un valioso recurso mediante la generación de compost o la digestión anaeróbica. En los últimos años, ambos procesos han tenido notables desarrollos en términos de diseño del proceso y su control.

El uso de microorganismos no está restringido únicamente al tratamiento de compuestos orgánicos. En algunos casos, los organismos seleccionados pueden también reducir los cationes tóxicos de los metales pesados (como el selenio), a la forma elemental menos soluble y menos tóxica. Por lo tanto, el tratamiento biológico puede también aplicarse a las aguas superficiales contaminadas por metales pesados (MARTÍN, Carmen; *et al.*, 2004).

CAPÍTULO II.

MATERIALES Y MÉTODOS.

En el presente capítulo se realiza una revisión de los métodos, para la determinación de la actividad enzimática de la Ureasa y Catalasa. Así también como de los bioensayos con semillas, realizados con maíz (*Zea mays*), trigo (*Triticum aestivum*) y lechuga (*Lactuca sativa*).

La calidad y la salud de los suelos se miden a través de distintos indicadores que evalúan su funcionamiento (DORAN, J.W; *et al.*, 2002). Para medir la calidad, se consideran algunos parámetros, como son sus propiedades físicas, químicas, intercambio de gases, retención de humedad, nutrientes, la penetración de raíces, entre otros.

Para medir la salud del suelo se considera la eficiencia de procesos, como los ciclos de nutrientes y los flujos de energía, en este contexto, uno de los indicadores que se utiliza es la magnitud de la actividad de diferentes enzimas involucradas en los procesos antes mencionados (CERON, R.L y MELGAREJO, M.L, 2005).

Las enzimas son moléculas de naturaleza proteica, producidas por los seres vivos y que se encargan de acelerar reacciones químicas, o hacer posibles aquellas reacciones que de otra manera no se producirían. Son catalizadores biológicos que al reducir la energía de activación necesaria para las reacciones, transforman las sustancias involucradas en el metabolismo celular (BURNS, 1982).

La actividad enzimática del suelo es muy importante porque refleja el estado en el que se encuentran sus poblaciones microbianas, y su relación con la biología del

suelo, la producción de biomasa, la degradación de contaminantes y la conservación de ecosistemas (DORAN, J.W; *et al.*, 2002) (GIANFREDA, L y RUGGIERO, P, 2006).

En agricultura, la actividad enzimática y otros indicadores biológicos, como la biomasa microbiana, se emplean como una medida de la fertilidad y del impacto de esta actividad en los suelos (GARCÍA, R; *et al.*, 2008). En análisis ambiental, como un indicador de contaminación (SCHINNER, F; *et al.*, 1993), y en biotecnología, como medida de la eficiencia de los tratamientos biológicos para remediar suelos impactados por diferentes contaminantes, incluyendo los hidrocarburos (MARGESIN, R; *et al.*, 2000).

Las enzimas utilizadas en esta investigación son la **Ureasa** y la **Catalasa**, se eligieron por el papel que desempeñan en el suelo, en el caso de la Catalasa por la protección y el mantenimiento del balance oxidante / antioxidante; de las células vegetales (UACH, 2009).

La ureasa es una exoenzima que cataliza la reacción de hidrólisis de la urea (QUINTERO, R; *et al.*, 2005) y por su aporte de NITRÓGENO como fuente nutrientes para las plantas (MONTEJO, Marisol; *et al.*, 2009).

1.1. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA UREASA.

La ureasa es una exoenzima que cataliza la reacción de hidrolisis de la urea, el principal producto celular nitrogenado de la degradación de las proteínas y los ácidos nucleicos, el cual es más fácil de eliminar, que otras formas de nitrógeno (como el amoniaco) porque es soluble en agua y tiene menor toxicidad (BARAJAS-ACEVES, 2008).

La ureasa se encuentra principalmente en semillas, microorganismos e invertebrados. En las plantas, es un hexámero y se encuentra en el citoplasma. En las bacterias, consiste en dos o tres subunidades diferentes (Science in School, 2008).

En los últimos años los estudios sobre la ureasa se han dirigido a determinar la influencia de los parámetros biológicos y químicos sobre su actividad. Se ha encontrado que la correlación con la biomasa microbiana no es significativa, y que esta enzima es afectada por los metales pesados, la concentración de oxígeno y la disponibilidad de nitrógeno en diferentes tipos de suelo.

Algunos estudios realizados indican que existe sensibilidad a la contaminación por hidrocarburos y efluentes de taninos²¹, al determinar un índice de actividad del suelo con la inclusión de varias enzimas, como ureasas, fosfomonoesterasas y s-glucosidasas, así como la biomasa microbiana y el contenido de nitrógeno total.

1.1.1. Fundamento del método.

El método que se utilizó es el de Tabatabai y Bremner (1972), El método se basa en la determinación de amonio liberado en muestras de suelo incubado con solución de urea durante dos horas a 37°C en presencia de tolueno, para inhibir el crecimiento de los microorganismos (ALEF, K y NANNIPIERI, P., 1998); (QUINTERO, R; *et al.*, 2005). Los resultados varían de 12.98 a 336.7 μ moles NH₃/g h.

La actividad enzimática de la ureasa en el suelo, es una técnica útil para evaluar suelos contaminados con hidrocarburos, y sujetos a un proceso de biorremediación.

1.1.2. Procedimiento.

Se colocaron 5g de una muestra de suelo (tamizado previamente en un tamiz Mesh 0.5mm) en un matraz volumétrico de 50cc se agregaron 0.2cc de tolueno y 9cc del amortiguador TRIS²², y se procede a mezclar. Posteriormente, se adiciona al matraz 1cc

²¹ Tanino: Originalmente utilizado para describir ciertas sustancias orgánicas que servían para convertir a las pieles crudas de animales en cuero (curtido).

²² Hidroxi metil aminometano.

de una solución de urea 0.2 M y se procede a mezclar, finalmente se tapan los matraces y se incuban por dos horas a 37°C.

Concluido el período de incubación, se agregaron 35cc de una solución de Cloruro de Potasio (KCl) – Sulfato de plata (Ag_2SO_4), 2.5 M (Ver anexo D) se agita y deja en reposo a temperatura ambiente durante cinco minutos, posteriormente se afora el contenido en un matraz de 50cc con (KCl - Ag_2SO_4), con agitación.

1.1.3. Control.

El control se prepara siguiendo el procedimiento descrito anteriormente, pero añadiendo 1cc de solución de Urea 0.2 M después de haber agregado la solución de (KCl - Ag_2SO_4).

1.1.4. Estimación del amonio desprendido.

Se tomaron 20cc de la muestra incubada y se colocan en un balón de destilación de 100cc, se agregaron 0.2g de Óxido de Magnesio (MgO) y se procede a destilar hasta recolectar 20cc. En la salida se colocó un vaso de precipitación con 5cc de la solución indicadora del ácido bórico (Ver ilustración 13 y 14).



Ilustración 13. Destilación de las muestras incubadas, 2013.

Fuente los autores.

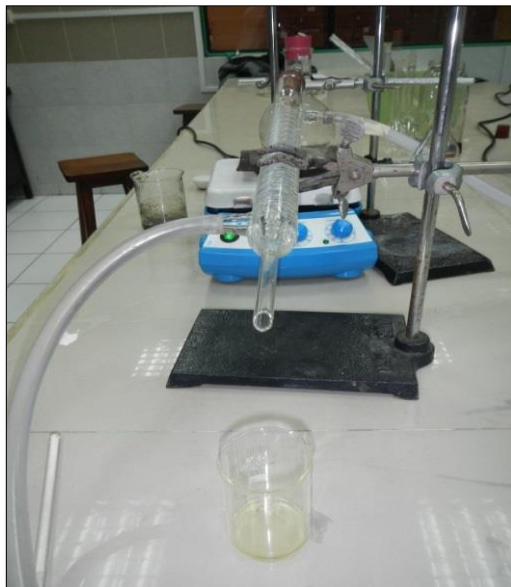


Ilustración 14. Concentrado de destilación, 2013.

Fuente los autores.

Finalmente se titula el destilado con ácido sulfúrico (H_2SO_4) 0.005 M. cada 1cc de H_2SO_4 0.005 M. que es equivalente a 70 μg de Amonio (N-NH_4).



Ilustración 15. Viraje de la solución en la titulación, 2013.

Fuente los autores.

1.2. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA CATALASA.

La Catalasa forma parte de los sistemas de detoxificación de las células, vegetales, de bacterias aerobias y anaerobias facultativas. La reacción específica que cataliza es la ruptura del agua oxigenada (H_2O_2), para formar agua y oxígeno.

El agua oxigenada (H_2O_2) se forma en el transporte de electrones de la cadena respiratoria y en ciertas reacciones de hidroxilación y oxigenación (ALEF, K y NANNIPIERI, P., 1998).

La Catalasa se relaciona con la actividad microbiana del suelo, por ser una enzima intracelular presente en microorganismos aerobios y en la mayoría de los anaerobios facultativos.

Se han empleado muchos métodos para determinar la actividad de la catalasa, los cuales miden la cantidad de oxígeno liberado (O_2) o el agua oxigenada (H_2O_2) remanente.

El oxígeno puede cuantificarse por volumetría de gases o cromatografía de gases. El agua oxigenada (H_2O_2) se determina por volumetría o colorimetría (GARCÍA, C; *et al.*, 2003).

1.2.1. Fundamento del método.

Para los ensayos de la toxicidad de los suelos mediante la determinación de la actividad enzimática de la Catalasa, en un suelo contaminado con hidrocarburos y a suelos sujetos a un proceso de biorremediación se sigue el siguiente procedimiento.

1.2.2. Procedimiento.

Se pesan 0.5g de suelo tamizado en tamiz “Mesh” con tamaño de poro de 0.5mm, posteriormente se depositan en un matraz, se agregan 40cc de agua destilada, se tapa y agita por 30 minutos en un agitador rotatorio (30 revoluciones por minuto).

Transcurrido el tiempo, se adicionaron 5cc de la solución de agua oxigenada H_2O_2 en una relación (1:100), se tapa nuevamente y agita por 10 minutos, se añade 5cc de la solución de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 1.5 M con la finalidad de parar la reacción enzimática y estabilizar el agua oxigenada H_2O_2 remanente; posteriormente se filtra.

1.2.3. Medición del peróxido de hidrógeno remanente.

Se toma una alícuota de 25cc del filtrado de cada muestra y se titula lentamente con la solución de permanganato de potasio ($KMnO_4$ 0.01M), con agitación. Las

primeras gotas del permanganato se decoloran lentamente pero luego la reacción se hace más rápida. La valoración se fundamenta en el color rosa permanente.

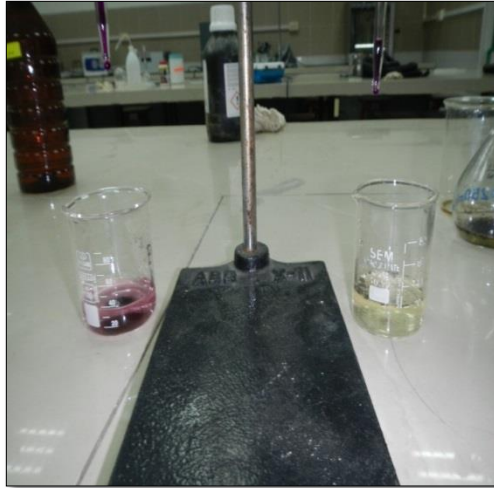


Ilustración 16. Proceso de titulación, 2013.

Fuente los autores.



Ilustración 17. Viraje de muestras, 2013.

Fuente los autores.

1.2.4. Controles.

Los controles se preparan sustituyendo los 5cc de agua oxigenada (H_2O_2) por un volumen igual de agua destilada y se adicionan al suelo; se procede de la misma forma que para las muestras problema.

También se prepara un blanco con 40cc de agua destilada, 5cc de agua oxigenada (H_2O_2) en una relación (1:100) y 5cc de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 1.5 M. A este blanco no se le adiciona suelo, pero si agua oxigenada H_2O_2 . Sirve para indicar la cantidad de H_2O_2 que podría poseer la muestra como remanente al final de la incubación, si la actividad de la catalasa fuese nula.

El procedimiento de titulación es igual, tanto para los controles como para el blanco. La concentración inicial del agua oxigenada (H_2O_2) que se añade al suelo se determina por la valoración con la solución de permanganato de potasio (KMnO_4) 0.01M del blanco sin suelo y con H_2O_2 .

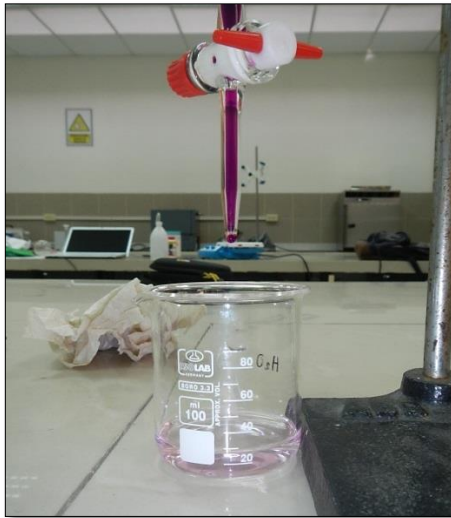


Ilustración 18. Proceso de titulación del blanco, 2013.

Fuente los Autores.

Ver Anexo E, Materiales, Reactivos y Soluciones utilizados en la Actividad enzimática Catalasa.

1.3. EVALUACION DE LA TOXICIDAD DE LOS SUELOS MEDIANTE

ENSAYOS CON SEMILLAS.

Para el efecto se hace la valoración de la toxicidad del suelo mediante semillas de trigo (*Triticum aestivum*), lechuga (*Lactuca sativa*), y semillas de Maíz (*Zea mays*). Se utilizan muestras de suelo sujeto a un proceso de biorremediación realizado en la Universidad Politécnica Salesiana titulado “Valoración de consorcios microbianos en la biorremediación de hidrocarburos aromáticos policíclicos HAPs” citado precedentemente.

1.3.1. Fundamento del método.

Este bioensayo es una prueba aguda, con exposición a 14 días, en la que se exponen las semillas a varias diluciones de muestras de extractos del suelo problema, y posteriormente se mide la inhibición de la germinación, del crecimiento temprano de las plántulas, y la producción de biomasa a través de las concentraciones efectivas medias (CE50) (CANTU, 2007). Las cuales representan las concentraciones de los extractos de suelo que ocasionan una inhibición del 50% en cada una de estas respuestas, comparadas con la respuesta máxima observada en el control negativo, como nos explica Carmen Infante y Fernando Morales en su investigación titulada “Evaluación de la toxicidad en desechos y suelos petrolizados empleando semillas de *Lactuca sativa L* (2012)

1.3.2. Procedimiento.

A continuación se detalla el método utilizando extractos de suelo y semillas para la determinación de la toxicidad del suelo.

El método se desarrolla en tres fases, la primera fase que tiene que ver con todo lo relacionado al suelo, toma de muestras y clasificación de las mismas, tratamiento previo a realizar los extractos y realización de los extractos.

La segunda fase por otro lado tiene que ver con las semillas, identificación, pruebas de viabilidad y preparación de las mismas para la prueba.

Por último, la tercera fase tiene que ver con la prueba donde las semillas son colocadas ya en los extractos de suelo obtenidos anteriormente.

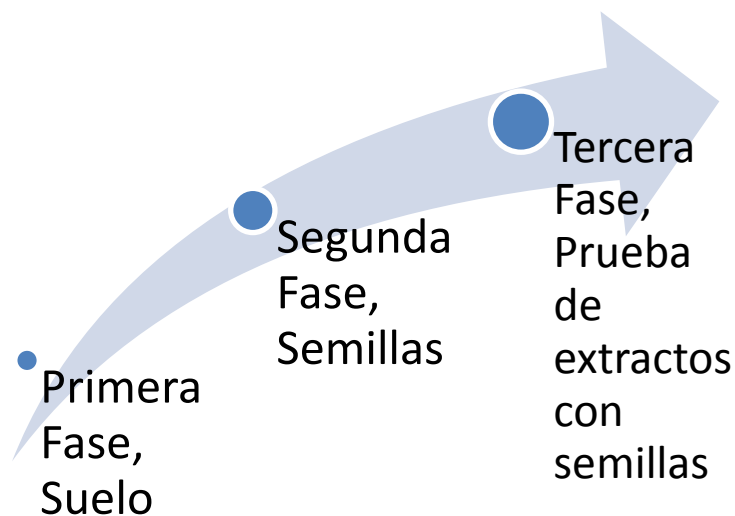


Ilustración 19. Fases, bioensayos con semillas, 2013.

Fuente los autores.

1.3.3. Primera fase, suelo.

Ubicación del lugar de ensayo.

La toma de muestras de suelo sujeto a un proceso de biorremediación en microcosmos de suelo se tomó en un área situada a 15 Km. Al noreste de la Ciudad de Cuenca, en la provincia del Azuay –Ecuador.

(Ver Ilustración 20), se tomaron muestras de suelo de cada uno de los tratamientos para su valoración.

Ver anexo F, Materiales, Reactivos y Soluciones utilizados en Bioensayos con semillas.



Ilustración 20. Cajas con suelos biorremediados, 2013.

Fuente los autores.

“Los tratamientos utilizados en el proceso de biorremediación, son tres y están formados por consorcios de hongos del género *Trichoderma* sp. (Ver Anexo “I”)

Las muestras de suelo se tomaron en fundas plásticas ziploc, y previo al análisis el suelo fué sacado, y tamizado mediante un tamiz Mesh de 0,5 mm y pulverizadas en un mortero con el fin de obtener partículas finas y facilitar la extracción del hidrocarburo.



Ilustración 21. Trituración y preparación del suelo, 2013.

Fuente los autores.

El resultado del análisis químico del suelo previo al proceso de biorremediación se detalla en la tabla 6.

ANÁLISIS QUÍMICO DEL SUELO.

PARAMETRO	RESULTADO
pH	6,33
CONDUCTIVIDAD (uS)	212
CONSISTENCIA	Arenosa
P	8,51mg/kg
Ca	1470,89mg/kg
Mg	450,59mg/kg
Na	186,31mg/kg
K	152,66mg/kg
NITRÓGENO TOTAL	0.28%.
MATERIA ORGANICA	14.4%
LIMO	0,04%
ARENA	92,75%
ARCILLA	7,21%

Tabla 6. Análisis químico del suelo, 2013.

Fuente Ernesto Delgado, PhD.

Los extractos se obtienen por medio de un equipo SOXHLET, y entre los materiales consta una estufa, papel filtro (cartucho de celulosa), sulfato de sodio anhidrido y éter di etílico como reactivos.

Este método sirve para extraer compuestos que se encuentran contenidos en un elemento solido a través de un disolvente.

Primer paso, con el papel filtro se forma un sobre que contiene la mezcla del suelo con el sulfato de sodio anhidrido (1:1), en este caso 10g; colocar el sobre con la mezcla debidamente rotulado dentro del extractor (Ver Ilustración 22).

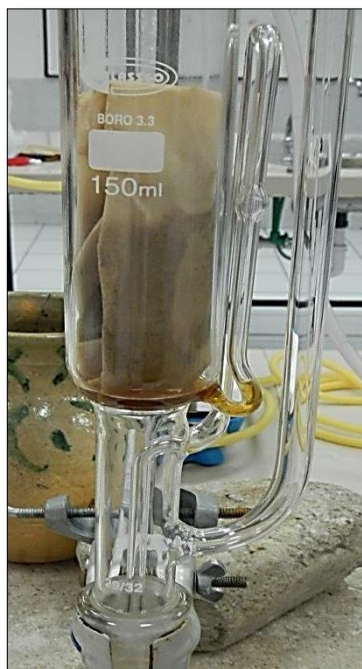


Ilustración 22. Muestra de suelo para reflujos, 2013.

Fuente los autores.

En el balón se colocan 160cc de éter di etílico y unos cristales que sirvan como perlas de ebullición. El refrigerante debe mantener una corriente de agua continua para evitar que el disolvente se evapore, si es necesario también se puede colocar un tapón en la parte superior del refrigerante.



Ilustración 23. Éter para condensación y cristales de ebullición, 2103.

Fuente los autores.

Una vez listo el equipo, se procede a encender la estufa, la misma que calentará el balón que contiene el disolvente. Se debe tener especial cuidado con la temperatura de la estufa debido a que el punto de ebullición del disolvente es de 35°C y se evapora con rapidez.



Ilustración 24. Equipo para reflujos, 2013.

Fuente los autores.

De igual manera se debe revisar cuidadosamente, cada una de las conexiones del equipo para evitar fugas ya sea de agua, de disolvente evaporado o de disolvente. Una vez prendida la estufa y el disolvente en estado de ebullición se comienza a observar un goteo del disolvente ya condensado dentro de la cavidad del extractor donde se encuentra el sobre con la mezcla.



Ilustración 25. Disolvente condensado, 2013.

Fuente los autores.

El goteo producirá que la cavidad se llene de disolvente y esto su vez en un reflujo que enviara al disolvente de nuevo al balón; este proceso se debe repetir 6 veces y finalmente se obtendrá el extracto de hidrocarburo de la muestra de suelo. Al tener en total 12 muestras de suelo este proceso se repite por cada una de ellas y además se realiza una muestra más de un suelo que fue tomado como prueba.



Ilustración 26. Disolvente con el suelo listo para el reflujó, 2013.

Fuente los autores.



Ilustración 27. Extracto de suelo, con cristales de ebullición, 2013.

Fuente los autores.

Cuando se hayan obtenido ya los extractos de cada una de las 13 muestras de suelo, se procede a almacenarlos y etiquetarlos debidamente para evitar posibles confusiones.

Debido a que en el extracto que se obtuvo existe una buena cantidad de disolvente (éter di etílico) es necesario realizar una evaporación del mismo para que pueda ser reutilizado haciendo uso del rota-vapor, el cual recupera el disolvente a base de calentar el extracto a baño maría.



Ilustración 28. Rota vapor para recuperación de solvente, 2013.

Fuente los autores.

Este proceso es muy rápido por lo que se debe tener especial cuidado en no evaporar toda la muestra. Una vez terminado este proceso para cada uno de los extractos de suelo se recupera el disolvente y los extractos se los envasan en frascos limpios y se los rotula debidamente. La cantidad de disolvente que se recupera es una cantidad considerable (50% a 60% del disolvente utilizado) por lo que se tiene que guardar teniendo cuidado de no mezclar con el disolvente sin utilizar (nuevo).

1.3.4. Segunda fase, semillas.

Para la realización de este trabajo se utilizó semillas de trigo (*Triticum aestivum*), lechuga (*Lactuca sativa*) y maíz (*Zea mays*) (Ver Ilustración 29).



Ilustración 29. Semillas lechuga, trigo y maíz, 2013.

Fuente los autores.

En el caso de las semillas, previo a ser utilizadas en la práctica deben ser sometidas primero a una prueba de viabilidad, la misma que servirá para seleccionar solo las semillas que tienen la debida capacidad de germinación para poder ser usadas. Esto se realiza principalmente para poder tener semillas que no fallen en la prueba.

Para comenzar la prueba de viabilidad las semillas primero se desinfectaron en una solución de hipoclorito de sodio, para ello se las sumergen en la solución durante 15 minutos, luego se lavan en agua destilada y finalmente se las coloca en un recipiente de agua destilada durante 15 minutos más, para eliminar los residuos de la solución de hipoclorito de sodio. Una vez listas las semillas se procede a la prueba de viabilidad

mediante el método químico de cloruro de trifeniltetrazolio (MOORE, 1985). Este método, también llamado prueba rápida de germinación, consiste en probar en un periodo de 24 a 48 h la capacidad de germinación de un lote de 50 semillas tomadas al azar.

Esta prueba se basa en la actividad de las enzimas deshidrogenasas, particularmente las deshidrogenasas del ácido málico, que reduce la sal de tetrazolio en los tejidos vivos de las semillas. En esta reacción los iones H^+ son transferidos a la referida sal. Cuando la semilla se sumerge en la solución de cloruro de trifeniltetrazolio, ocurre la reacción de reducción en las células vivas y se forma un compuesto de color rojo (trifenilformazan) que indica la presencia de actividad respiratoria en las mitocondrias y, consecuentemente, que el tejido es viable. Los tejidos muertos (no viables) no reaccionan con la solución y conservan su color natural (G, Adam y H, Duncan, 2002).

Luego de haber sido desinfectadas las semillas y realizada ya la solución a utilizar (Solución de cloruro de trifeniltetrazolio al 1%). Se procede a remojar las 50 semillas en agua destilada de 4 a 18 horas a temperatura ambiente. Dependiendo el tamaño de las semillas, si son grandes, se las coloca en un vaso de precipitación de 250cc con 150 a 200cc de la solución de cloruro de trifeniltetrazolio y si son pequeñas como las de lechuga en este caso se las coloca en un vaso de 125cc con 80 a 100cc de la misma solución. En el caso de las semillas de lechuga por su tamaño se las deja reposar durante dos horas, las semillas más grandes como las de maíz unas veinte y cuatro horas y las de trigo alrededor de doce horas, todas ellas en oscuridad y con una temperatura de 30°C.



Ilustración 30. Semillas pruebas de viabilidad, 2013.

Fuente los autores.

Una vez transcurrido el tiempo de cada una de las semillas se podrá observar el cambio de coloración en las mismas por efecto de la solución de (TRIS) trifetil tetrazolio, (Ver ilustración 31 y 32).



Ilustración 31. Semillas aptas para germinación, 2013.

Fuente los autores.



Ilustración 32. Semillas de maíz, con coloración, 2013.

Fuente los autores.

Se considera la coloración, para determinar la viabilidad de las semillas para el análisis, posteriormente se las lava con agua corriente bajo un flujo reducido, se las seca y están listas para comenzar la tercera fase.

1.4. BIOENSAYOS CON SEMILLAS.

De los tres tipos de semillas utilizadas en el proyecto, trigo (*Triticum aestivum*), lechuga (*Lactuca sativa*) y maíz (*Zea mays*), en la prueba de viabilidad resultaron la mayoría de semillas con coloración.

En el caso del trigo (*Triticum aestivum*) se coloreo alrededor del 95% de las mismas, al igual que las de lechuga (*Lactuca sativa*) y en el caso del maíz (*Zea mays*) el porcentaje coloreado fue de entre 85 y 90%, en el caso de estas últimas la coloración se observó más leve en comparación con las otras 2 semillas. Una vez listas las semillas se procede a colocar en las cajas Petri el papel filtro; el mismo que servirá para retener humedad para las semillas. En cada caja Petri se colocaron 3 semillas de maíz, 5 de trigo y 10 de lechuga, aparte de esto se le adicionaron 2cc del extracto de suelo.

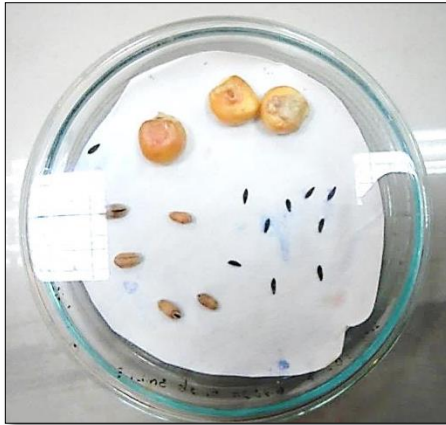


Ilustración 33. Semillas para la prueba de germinación, 2013.

Fuente los autores.

Es importante dejar espacio entre las semillas para que estas se puedan desarrollar normalmente dentro de la caja.



Ilustración 34. Semillas junto al extracto de suelo con hidrocarburo, 2013.

Fuente los autores.

En el caso del control negativo se adicionan 2cc de agua destilada en el papel filtro igualmente se prepara un tratamiento control con el disolvente empleado para

preparar los extractos del suelo, en este caso éter. Una vez preparadas todas las cajas deben ser colocadas en la cámara oscura a una temperatura controlada de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$.



Ilustración 35. Semillas en la cámara de germinación, 2013.

Fuente los autores.

Es importante rotular todas las cajas para evitar confusiones el momento de recoger datos. Cuando se observe que al menos el 65% de las semillas en el control negativo (agua destilada) han germinado y sus radículas muestran un tamaño de al menos 5mm de largo, deben evaluarse las variables de respuesta en todos los tratamientos. Para ello, se extraen las plántulas de las cajas de Petri.

Con la regla o el vernier se mide la altura de las plántulas (longitud del hipocotíleo) y la longitud de la radícula; para determinar la producción de biomasa, se pesan las plántulas en una balanza analítica, para lo cual previamente se colocan en cajas de Petri y se meten en la estufa a 75°C durante 20 a 24h para eliminar la humedad.



Ilustración 36. Semillas germinadas en cajas Petri, 2013.

Fuente los autores.

Las semillas de la prueba con agua destilada se demoraron alrededor de 7 días para germinar y tener el mínimo necesario para evaluar las diferentes variables. Una vez retiradas todas las cajas Petri se procede a realizar la medición de radícula e hipocotíleo, y enseguida se las coloca en la estufa para que las semillas eliminen toda la humedad.



Ilustración 37. Conteo y evaluación de variables de desarrollo, 2013.

Fuente los autores.

CAPÍTULO III.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

1. RESULTADOS.

Para el análisis estadístico de los datos se usó el paquete estadístico Minitab 15, se establece un análisis de varianza ANOVA, y una prueba de Tukey con intervalos de confianza simultáneos del 95%.

ANÁLISIS SEMILLA.- FACTOR DE GERMINACIÓN.

A. LONGITUD DE RADÍCULA EN SEMILLAS DE MAÍZ (*Zea mays*).

Se consideran las siguientes Hipótesis en el análisis:

H0: La concentración de Hidrocarburos aromáticos policíclicos HAPs presente en el suelo, luego de un proceso de biorremediación, no afecta al proceso normal de germinación de semillas de maíz (*Zea mays*).

H1: La concentración de Hidrocarburos aromáticos policíclicos HAPs presente en el suelo, luego de un proceso de biorremediación, afecta al proceso normal de germinación de semillas de maíz (*Zea mays*).

Los datos para el análisis, que representan la longitud de la radícula en milímetros se reporta en la tabla 7.

Radícula Maíz				
Repet/Trat	T1	T2	T3	P
1	0	5,66	7	0
2	2,66	12	16,33	5,66
3	5,33	8,33	0	8,33
4	8,33	16,66	6	5,83
x	4,08	10,66	7,66	4,95

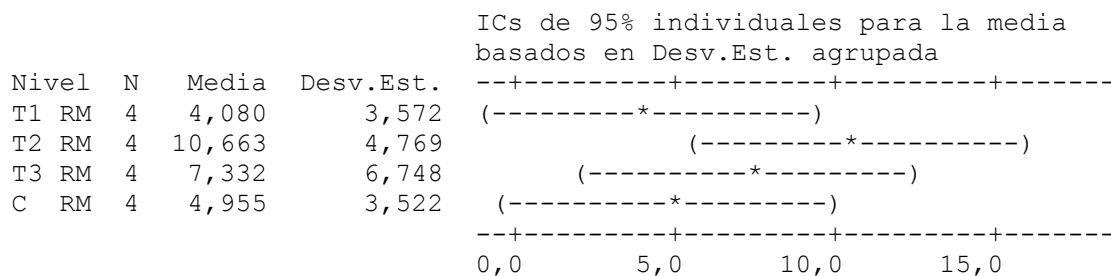
Tabla 7. Longitud de radícula en semillas de maíz, 2014.

Fuente los autores.

ANOVA

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Factor	3	104,0	34,7	1,48	0,269
Error	12	280,3	23,4		
Total	15	384,3			

S = 4,833 R-cuad. = 27,06% R-cuad.(ajustado) = 8,82%



Desv.Est. agrupada = 4,833

De acuerdo al valor de $P = 0,269$, mayor que el nivel de significancia 0.05 se acepta la hipótesis cero.

H0: “La concentración de Hidrocarburos aromáticos policíclicos HAPs, presente en el suelo, luego de un proceso de biorremediación, no afecta al proceso normal de germinación de semillas de maíz (*Zea mays*)”.

CONCLUSIÓN: No existe diferencia significativa entre los tratamientos y el control.

En la ilustración 38, se muestra mediante un diagrama de cajas el análisis estadístico de los tratamientos con respecto al control.

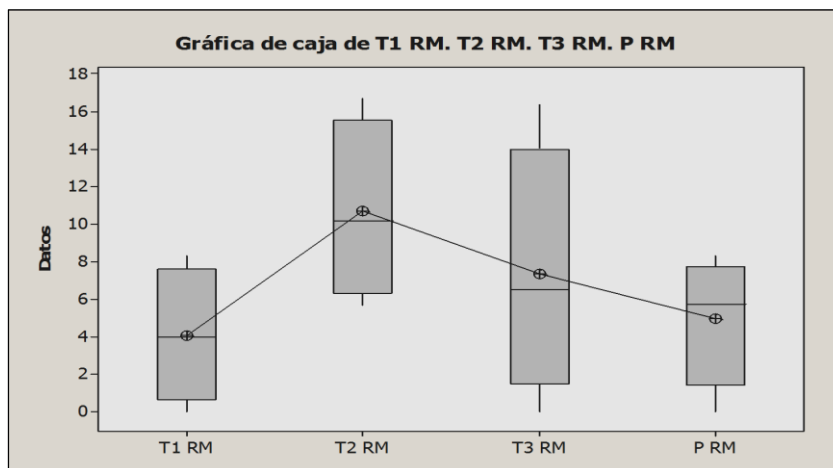


Ilustración 38. Longitud de Radícula en semillas de Maíz, 2014.

Fuente los autores.

B. LONGITUD DE LA RADÍCULA EN SEMILLAS DE TRIGO (*Triticum aestivum*).

Se consideran las siguientes Hipótesis en el análisis:

H0: La concentración de Hidrocarburos aromáticos policíclicos HAPs, presente en el suelo, luego de un proceso de biorremediación, no afecta al proceso normal de germinación de las semillas de trigo (*Triticum aestivum*).

H1: La concentración de Hidrocarburos aromáticos policíclicos HAPs, presente en el suelo, luego de un proceso de biorremediación, afecta al proceso normal de germinación de las semillas de trigo (*Triticum aestivum*).

Los datos para el análisis, que representan la longitud de la radícula en milímetros se reporta en la tabla 8.

Radícula Trigo				
Repet/Trat	T1	T2	T3	P
1	0	0,1	0	0,4
2	0	0,2	0	0,1
3	0,2	0,3	0,2	0,2
4	0,2	0	0,1	0
x	0,1	0,15	0,075	0,175

Tabla 8. Longitud de la Radícula en semillas de Trigo, 2014.

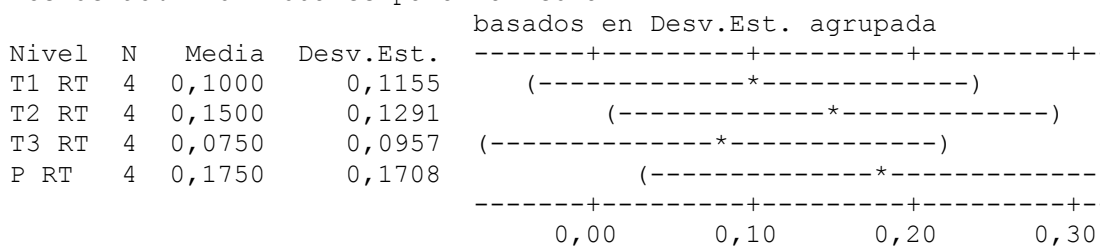
Fuente los autores.

ANOVA.

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Factor	3	0,0250	0,0083	0,49	0,697
Error	12	0,2050	0,0171		
Total	15	0,2300			

S = 0,1307 R-cuad. = 10,87% R-cuad. (ajustado) = 0,00%

ICs de 95% individuales para la media



Desv.Est. agrupada = 0,1307

De acuerdo al valor de (P) = 0.697 considerando el nivel de significancia del 0,05, no existe estadísticamente una diferencia significativa, entre los grupos de datos, por lo que se acepta la hipótesis **nula**.

H0: “La concentración de Hidrocarburos aromáticos policíclicos presente en el suelo, luego de un proceso de biorremediación, de hidrocarburos aromáticos policíclicos HAPs, no afecta al proceso normal de germinación de semillas de trigo (*Triticum aestivum*)”.

En el gráfico de cajas ilustración 39, se aprecia la disposición de los tratamientos frente al control.

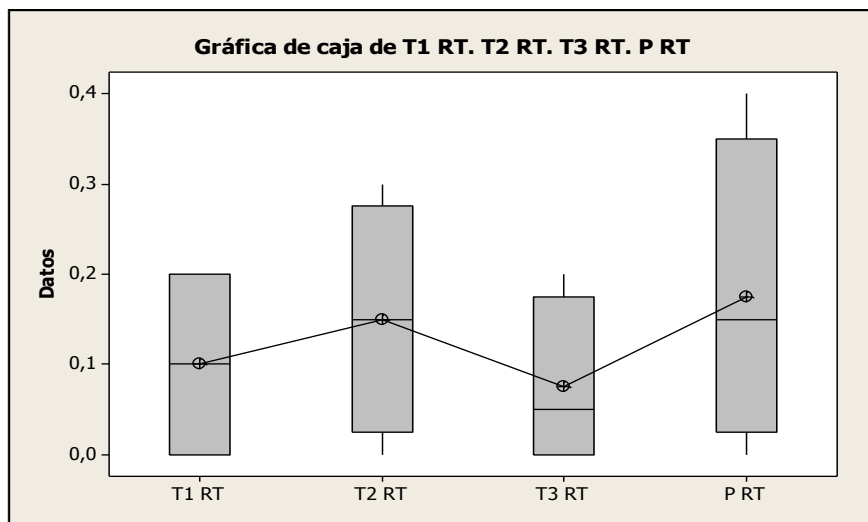


Ilustración 39. Longitud de la Radícula en semillas de Trigo, 2014.

Fuente los autores.

CONCLUSIÓN: Existe diferencia entre las medias del grupo de datos, aunque esta diferencia estadísticamente no es significativa.

C. LONGITUD DE LA RADÍCULA EN SEMILLAS DE LECHUGA (*Lactuca sativa*).

Se consideran las siguientes Hipótesis en el análisis:

H0: La concentración de Hidrocarburos aromáticos policíclicos HAPs, presente en el suelo, luego de un proceso de biorremediación, no afecta al proceso normal de germinación de semillas de lechuga (*Lactuca sativa*).

H1: La concentración de Hidrocarburos aromáticos policíclicos HAPs, presente en el suelo, luego de un proceso de biorremediación, afecta al proceso normal de germinación de semillas de lechuga (*Lactuca sativa*).

Los datos para el análisis, que representan la longitud de la radícula en milímetros se reporta en la tabla 9.

Radícula Lechuga				
Repet/Trat	T1	T2	T3	P
1	0,2	2,25	1,4	1,6
2	0,4	1,7	2,6	1,2
3	1,45	3,3	1,8	2,1
4	0,1	3,2	0,9	1,7
x	0,53	2,61	1,67	1,65

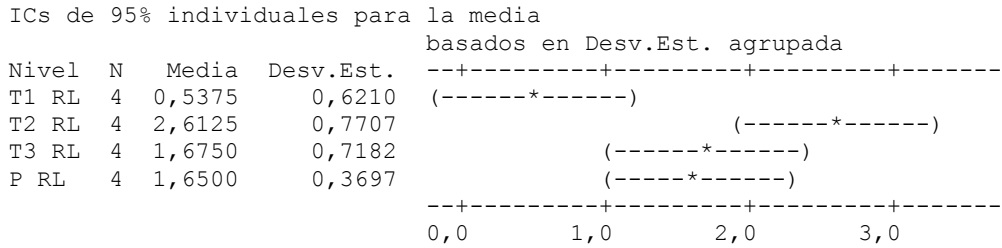
Tabla 9. Longitud de la radícula en semillas de Lechuga, 2014.

Fuente los autores.

ANOVA.

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Factor	3	8,643	2,881	7,06	0,005
Error	12	4,896	0,408		
Total	15	13,539			

S = 0,6388 R-cuad. = 63,84% R-cuad. (ajustado) = 54,80%



Desv.Est. agrupada = 0,6388

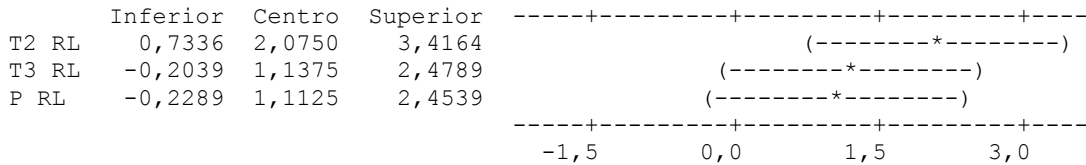
El valor de $P = 0,005$ es menor que el valor de significancia establecido 0,05 por lo que se determina que existe diferencia significativa entre los tratamientos, y se procede al análisis mediante una prueba de TUKEY.

Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%.

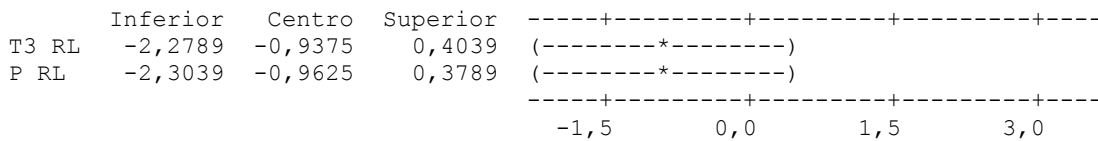
Todas las comparaciones en parejas.

Nivel de confianza individual = 98,83%

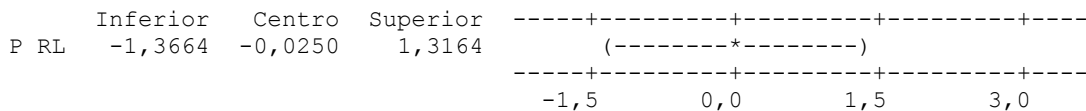
Se restó T1 RL a:



Se restó T2 RL a:



Se restó T3 RL a:



Se puede observar que existe diferencia significativa entre el tratamiento 1 y el tratamiento 2, siendo este el mejor.

CONCLUSIÓN: Se acepta la hipótesis **alternativa**.

H1: “La concentración de Hidrocarburos aromáticos policíclicos HAPs, presente en el suelo, luego de un proceso de biorremediación, afecta al proceso normal de germinación de semillas de lechuga (*Lactuca sativa*)”.

En la ilustración 40 se puede ver un gráfico de cajas producto del análisis estadístico.

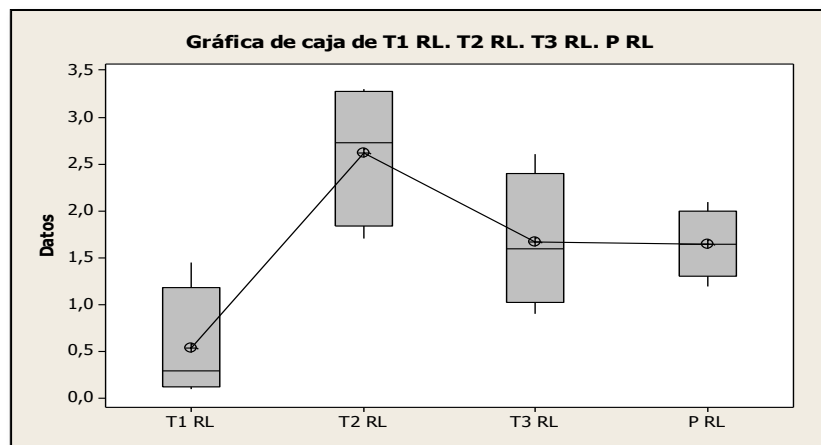


Ilustración 40. Longitud de la radícula en semillas de Lechuga, 2014.

Fuente los autores.

La diferencia se establece entre el control y el tratamiento 1; mientras que el control con respecto al tratamiento 3 y 2 esta diferencia no es altamente significativa.

D. LONGITUD DEL HIPOCÓTILO EN SEMILLAS DE MAÍZ.

Se consideran las siguientes Hipótesis en el análisis:

H0: La concentración de Hidrocarburos aromáticos policíclicos presente en el suelo, luego de un proceso de biorremediación, no afecta al proceso normal de germinación de semillas de maíz (*Zea mays*).

H1: La concentración de Hidrocarburos aromáticos policíclicos HAPs, presente en el suelo, luego de un proceso de biorremediación, afecta al proceso normal de germinación de semillas de maíz (*Zea mays*).

Los datos para el análisis, que representan la longitud del hipocótilo en milímetros se reporta en la tabla 10.

Hipocótilo Maíz				
Repet/Trat	T1	T2	T3	P
1	0	4,66	5,33	0
2	5	16,66	9,66	10,33
3	4,33	4,66	1,33	3,7
4	6	14,66	7,33	8,2
x	3,83	10,16	5,9	5,55

Tabla 10. Longitud del hipocótilo en semillas de Maíz, 2014.

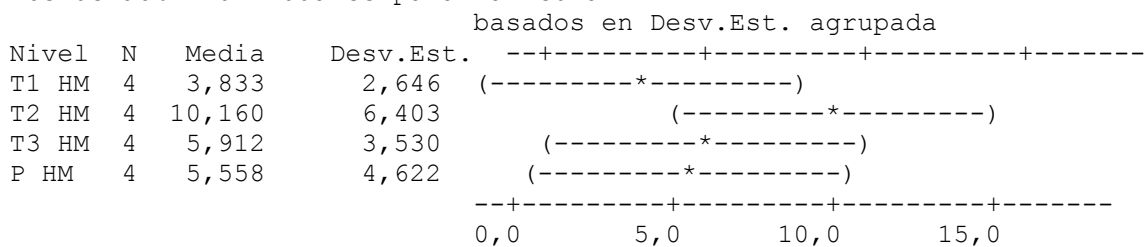
Fuente los autores.

ANOVA.

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Factor	3	86,7	28,9	1,41	0,287
Error	12	245,5	20,5		
Total	15	332,2			

S = 4,523 R-cuad. = 26,10% R-cuad. (ajustado) = 7,62%

ICs de 95% individuales para la media



Desv.Est. agrupada = 4,523

Basándose en el valor obtenido de $P = 0,287$, mayor al valor de significancia 0,05, se acepta la hipótesis **nula**.

H0: La concentración de Hidrocarburos aromáticos policíclicos HAPS, presente en el suelo, luego de un proceso de biorremediación, no afecta al proceso normal de germinación de la semilla de maíz (*Zea mays*).

En la ilustración 41, se muestra mediante un diagrama de cajas el análisis estadístico de los tratamientos con respecto al control.

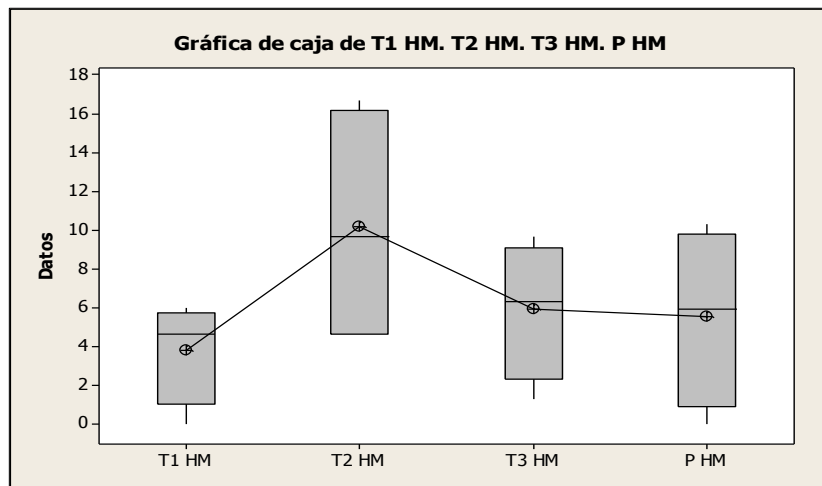


Ilustración 41. Longitud del hipocótilo en semillas de Maíz, 2014.

Fuente los autores.

CONCLUSIÓN: No existe diferencia significativa entre los tratamientos y el control.

E. LONGITUD HIPOCÓTILO EN SEMILLAS DE TRIGO (*Triticum aestivum*).

Cabe señalar que para el caso de las semillas de trigo (*Triticum aestivum*), existe desarrollo del sistema radicular, aunque no existe un desarrollo del hipocótilo, en cuatro repeticiones, por lo que no se pudo hacer un análisis estadístico.

F. LONGITUD DEL HIPOCÓTILO EN SEMILLAS DE LECHUGA (*Lactuca sativa*).

Cabe señalar que para el caso de las semillas de lechuga (*Lactuca sativa*), al igual que las semillas de trigo (*Triticum aestivum*), existe desarrollo del sistema radicular, aunque el desarrollo del hipocótilo es nulo, en las cuatro repeticiones, por lo que no se pudo hacer un análisis estadístico.

G. BIOMASA EN SEMILLAS DE MAÍZ (*Zea mays*).

Se consideran las siguientes Hipótesis en el análisis:

H0: La concentración de Hidrocarburos aromáticos policíclicos HAPs, presente en el suelo, luego de un proceso de biorremediación, no afecta al proceso normal de germinación de semillas de maíz (*Zea mays*).

H1: La concentración de Hidrocarburos aromáticos policíclicos HAPs presente en el suelo, luego de un proceso de biorremediación, afecta al proceso normal de germinación de semillas de maíz (*Zea mays*).

Los datos para el análisis, que representan el peso de la biomasa en gramos se reporta en la tabla 11.

Biomasa Maíz				
Repet/Trat	T1	T2	T3	P
1	2,45	2,13	2,26	1,8
2	2,32	2,17	2,06	2
3	1,88	2,06	2,23	2,1
4	2,38	2,1	1,75	2,33
x	2,257	2,11	2,08	2,05

Tabla 11. Biomasa en semillas de Maíz, 2014.

Fuente los autores.

ANOVA.

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Factor	3	0,0988	0,0329	0,77	0,534
Error	12	0,5148	0,0429		
Total	15	0,6136			

S = 0,2071 R-cuad. = 16,11% R-cuad.(ajustado) = 0,00%

ICs de 95% individuales para la media
basados en Desv.Est. agrupada

Nivel	N	Media	Desv.Est.	
T1 BM	4	2,2575	0,2572	(-----*-----)
T2 BM	4	2,1150	0,0465	(-----*-----)
T3 BM	4	2,0750	0,2339	(-----*-----)
P BM	4	2,0575	0,2204	(-----*-----)

2,00 2,20 2,40 2,60

Desv.Est. agrupada = 0,2071

El valor de $P = 0,534$ mayor que el nivel de significancia 0,05 nos permite aceptar la hipótesis **nula**:

H0: “La concentración de Hidrocarburos aromáticos policíclicos HAPs, presente en el suelo luego de un proceso de biorremediación, no afecta al proceso normal de germinación de semillas de maíz (*Zea mays*)”.

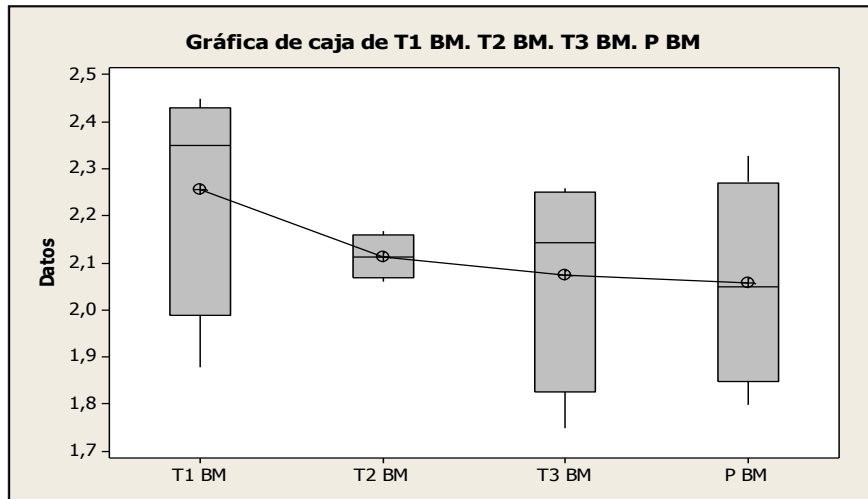


Ilustración 42. Biomasa en semillas de Maíz, 2014.

Fuente los autores.

Como se puede observar en el gráfico, los datos del T2 no varían en comparación con los otros tratamientos, donde los datos se encuentran más dispersos.

CONCLUSIÓN: no existe diferencia significativa entre los tratamientos y el testigo.

H. BIOMASA EN SEMILLAS DE TRIGO (*Triticum aestivum*).

Se consideran las siguientes Hipótesis en el análisis:

H0: La concentración de Hidrocarburos aromáticos policíclicos HAPs, presente en el suelo, luego de un proceso de biorremediación, no afecta al proceso normal de germinación de las semillas de trigo (*Triticum aestivum*).

H1: La concentración de Hidrocarburos aromáticos policíclicos HAPs presente en el suelo, luego de un proceso de biorremediación, afecta al proceso normal de germinación de las semillas de trigo (*Triticum aestivum*).

Los datos para el análisis, que representan el peso de la biomasa en gramos se reporta en la tabla 12.

Biomasa Trigo				
Repet/Trat	T1	T2	T3	P
1	0	0,21	0	0,25
2	0	0,23	0	0,2
3	0,26	0,25	0,17	0,18
4	0,26	0	0,17	0
x	0,13	0,17	0,085	0,15

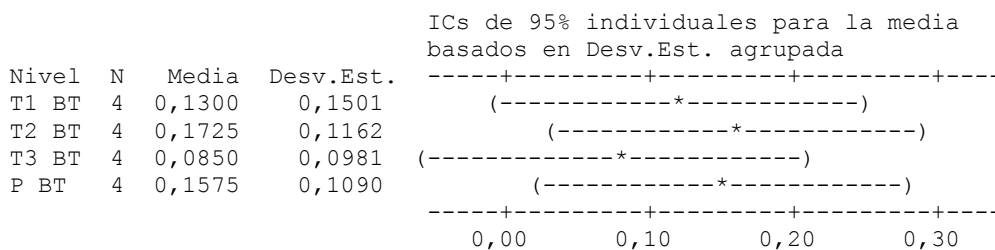
Tabla 12. Biomasa en semillas de Trigo, 2014.

Fuente los autores.

ANOVA.

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Factor	3	0,0177	0,0059	0,41	0,748
Error	12	0,1727	0,0144		
Total	15	0,1904			

S = 0,1199 R-cuad. = 9,31% R-cuad. (ajustado) = 0,00%



Desv.Est. agrupada = 0,1199

El valor de P para este factor es de 0,748, claramente superior que el valor de significancia 0,05 por lo que aceptamos la hipótesis **nula**.

H0: “La concentración de Hidrocarburos aromáticos policíclicos HAPs, presente en el suelo, luego de un proceso de biorremediación, no afecta al proceso normal de germinación de las semillas de trigo (*Triticum aestivum*)”.

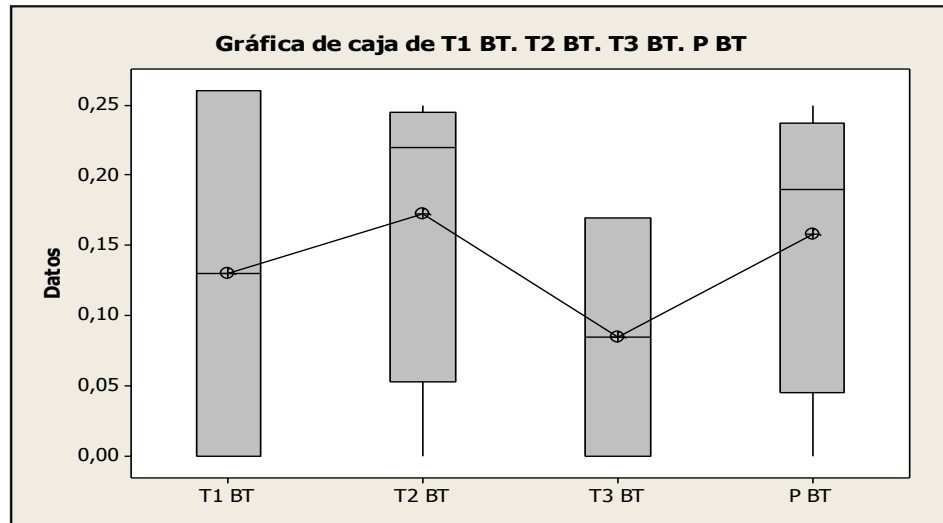


Ilustración 43. Biomasa en semillas de Trigo, 2014.

Fuente los autores.

CONCLUSIÓN: la diferencia que existe entre las medias no es significativa.

I. BIOMASA EN SEMILLAS DE LECHUGA (*Lactuca sativa*).

Se consideran las siguientes Hipótesis en el análisis:

H0: La concentración de Hidrocarburos aromáticos policíclicos HAPs presente en el suelo, luego de un proceso de biorremediación, no afecta al proceso normal de germinación de las semillas de lechuga (*Lactuca sativa*).

H1: La concentración de Hidrocarburos presente en el suelo, luego de un proceso de biorremediación, afecta al proceso normal de germinación de las semillas de lechuga (*Lactuca sativa*).

Los datos para el análisis, que representan el peso de la biomasa en gramos se reporta en la tabla 13.

Biomasa Lechuga				
Repet/Trat	T1	T2	T3	P
1	0,009	0,008	0,008	0,008
2	0,008	0,009	0,009	0,008
3	0,009	0,009	0,009	0,009
4	0,008	0,01	0,009	0,009
x	0,0086	0,0092	0,0088	0,0085

Tabla 13. Biomasa en semillas de Lechuga, 2014.

Fuente los autores.

ANOVA.

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Factor	3	0,0000007	0,0000002	0,58	0,640
Error	12	0,0000047	0,0000004		
Total	15	0,0000054			

S = 0,0006292 R-cuad. = 12,64% R-cuad. (ajustado) = 0,00%

Nivel	N	Media	Desv.Est.	ICs de 95% individuales para la media basados en Desv.Est. agrupada
T1 BL	4	0,0085000	0,0005774	(-----*-----)
T2 BL	4	0,0090000	0,0008165	(-----*-----)
T3 BL	4	0,0087500	0,0005000	(-----*-----)
P BL	4	0,0085000	0,0005774	(-----*-----)

-----+-----+-----+-----+-----
0,00800 0,00850 0,00900 0,00950

Desv.Est. agrupada = 0,0006292

Al igual que en la mayoría de factores, el valor de $P = 0,640$ mayor al nivel de significancia 0,05 por lo que se acepta la hipótesis nula H_0 : La concentración de Hidrocarburos presente en el suelo, luego de un proceso de biorremediación, no afecta al proceso normal de germinación de las semillas de lechuga (*Lactuca sativa*).

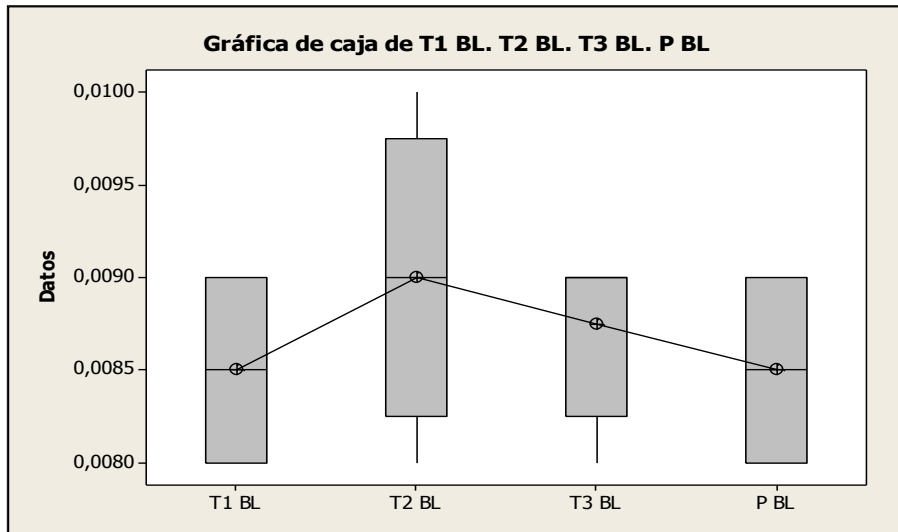


Ilustración 44. Biomasa en semillas de Lechuga, 2014.

Fuente los autores.

CONCLUSIÓN:

La biomasa de las semillas de lechuga (*Lactuca sativa*), en el análisis presenta un valor de 0,008g como valor inferior en los 3 tratamientos, mientras que el valor mayor corresponde al T2 repetición 4 con 0,01g.

En el caso de las medias, la mayor se encuentra en el T2 con 0,0092g y el menor en el testigo (suelo sin contaminación) con 0,0085g. Como se puede ver la diferencia entre tratamientos existe más no con una diferencia significativa.

ANÁLISIS ENZIMÁTICO.

A. UREASA.

Se consideran las siguientes Hipótesis en el análisis:

H0: La concentración de Hidrocarburos aromáticos policíclicos HAPs, presente en el suelo, luego de un proceso de biorremediación, no afecta a la actividad enzimática de la ureasa.

H1: La concentración de Hidrocarburos aromáticos policíclicos HAPs presente en el suelo, luego de un proceso de biorremediación, afecta a la actividad enzimática de la ureasa.

Los datos para el análisis, que representan la actividad enzimática de la ureasa en $\mu\text{g N} - \text{NH}_4/\text{g}$ de suelo seco x dos horas se reporta en la tabla 14.

Ureasa				
Repet/Trat	T1	T2	T3	P
1	0	175	918,75	927,5
2	43,75	262,5	831,25	918,75
3	87,5	218,75	962,5	1006,25
x	43,75	218,75	904,16	950,83

Tabla 14. Actividad enzimática Ureasa, 2014.

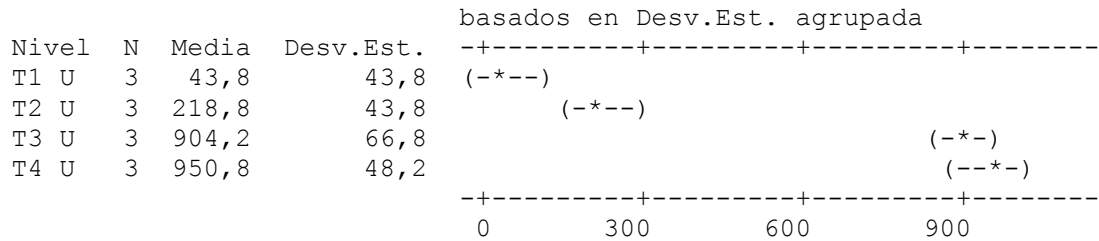
Fuente los autores.

ANOVA.

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Factor	3	1951246	650415	245,05	0,000
Error	8	21233	2654		
Total	11	1972480			

S = 51,52 R-cuad. = 98,92% R-cuad. (ajustado) = 98,52%

ICs de 95% individuales para la media



Desv.Est. agrupada = 51,5

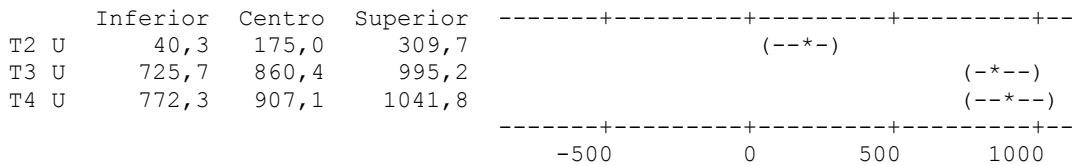
El valor de P en el análisis de varianza es igual a 0, es decir menor al nivel de significancia 0,05 por lo que existe una diferencia altamente significativa entre las medias. Se realizó una prueba de TUKEY para determinar el mejor tratamiento.

Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%.

Todas las comparaciones en parejas.

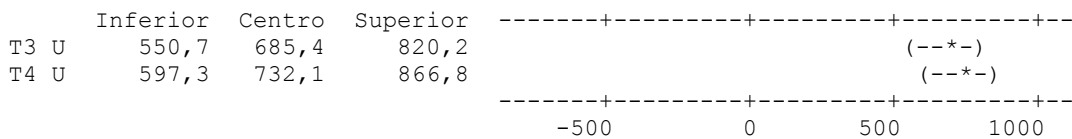
Nivel de confianza individual = 98,74%

Se restó T1 U a:



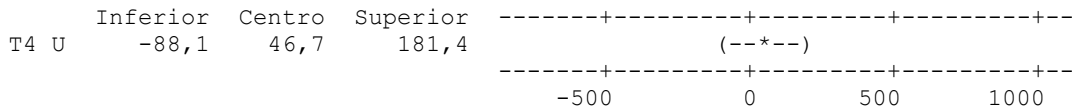
Como se puede observar existe una diferencia significativa entre los tratamientos 1 con los tratamientos 3 y 4

Se restó T2 U a:



Así mismo se puede observar que existe una diferencia significativa entre el T2 y los tratamientos 3 y 4.

Se restó T3 U a:



Finalmente se observa que entre los tratamientos 3 y 4 no existe una diferencia significativa.

CONCLUSIÓN:

Se puede observar que existe una diferencia significativa entre todos los tratamientos excepto entre los tratamientos 3 y el testigo (T4). Debido a los resultados obtenidos con el valor de P, se acepta como válida la hipótesis **alternativa**.

H1: “La concentración de Hidrocarburos aromáticos policíclicos HAPs presente en el suelo, luego de un proceso de biorremediación, afecta a la actividad enzimática de la ureasa”.

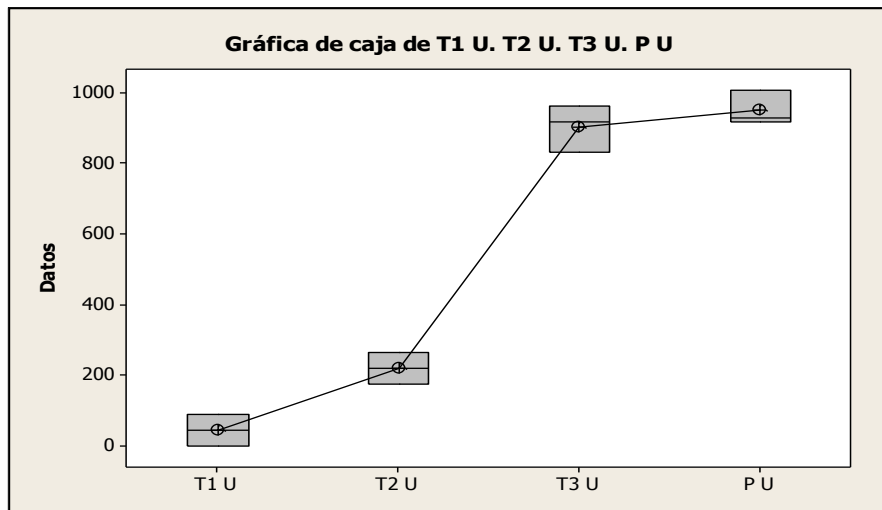


Ilustración 45. Actividad enzimática Ureasa, 2014.

Fuente los autores.

B. CATALASA.

Se consideran las siguientes Hipótesis en el análisis:

H0: La concentración de Hidrocarburos aromáticos policíclicos HAPs presente en el suelo, luego de un proceso de biorremediación, no afecta a la actividad enzimática de la catalasa.

H1: La concentración de Hidrocarburos aromáticos policíclicos HAPs presente en el suelo, luego de un proceso de biorremediación, afecta a la actividad enzimática de la catalasa.

Los datos para el análisis, que representan la actividad enzimática de la catalasa en moles de agua oxigenada (H_2O_2) consumidos/gramos de suelo seco x hora se reporta en la tabla 15.

Catalasa				
Repet/Trat	T1	T2	T3	P
1	0,294	0,207	0,098	0,163
2	0,261	0,217	0,12	0,174
3	0,272	0,228	0,076	0,217
x	0,275	0,217	0,098	0,184

Tabla 15. Actividad enzimática Catalasa, 2014.

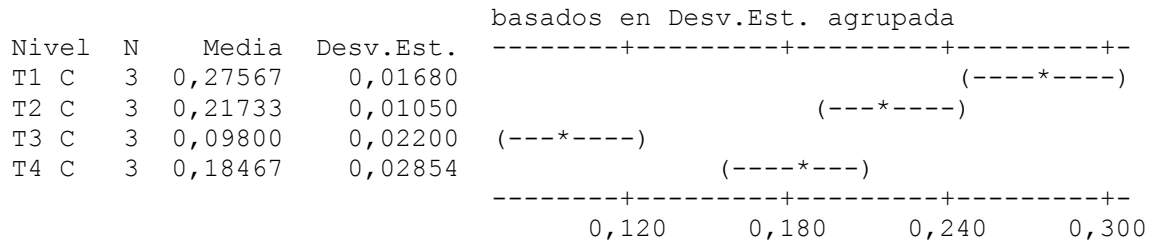
Fuente los autores.

ANOVA.

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Factor	3	0,049551	0,016517	39,07	0,000
Error	8	0,003382	0,000423		
Total	11	0,052933			

S = 0,02056 R-cuad. = 93,61% R-cuad. (ajustado) = 91,21%

ICs de 95% individuales para la media



Desv.Est. agrupada = 0,02056

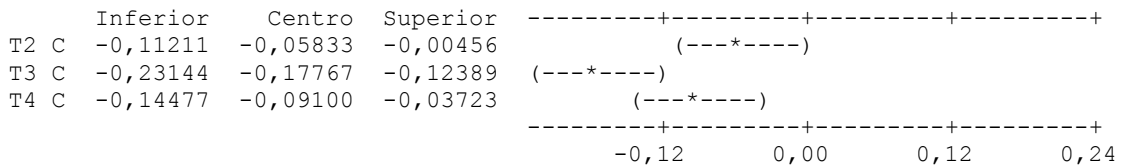
De acuerdo al nivel de significancia 0,05 mayor al valor de P calculado igual a 0, se puede observar que existe una diferencia significativa entre las medias por lo que se realizó una prueba de TUKEY para determinar el mejor tratamiento.

Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%.

Todas las comparaciones en parejas.

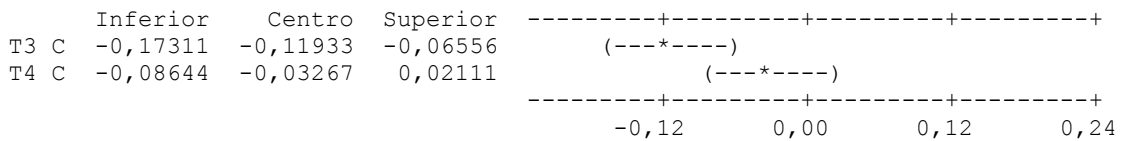
Nivel de confianza individual = 98,74%

Se restó T1 C a:



Se puede observar que existe una diferencia significativa entre el tratamiento 1 y el resto de tratamientos.

Se restó T2 C a:



Se puede observar que la diferencia entre los tratamientos 2 y 3 es significativa. Entre los tratamientos 2 y 4 no existe una diferencia significativa.

Se restó T3 C a:

	Inferior	Centro	Superior	
T4 C	0,03289	0,08667	0,14044	(---*---)

-0,12 0,00 0,12 0,24

Finalmente se puede observar que existe significancia entre la diferencia del tratamiento 3 y 4

CONCLUSIÓN:

Se puede observar que el tratamiento 1 tiene una diferencia significativa con todos los tratamientos presentándose claramente como el mejor. Debido a esto se acepta la hipótesis **alternativa**.

H1: “La concentración de Hidrocarburos presente en el suelo, luego de un proceso de biorremediación, afecta a la actividad enzimática de la catalasa”.

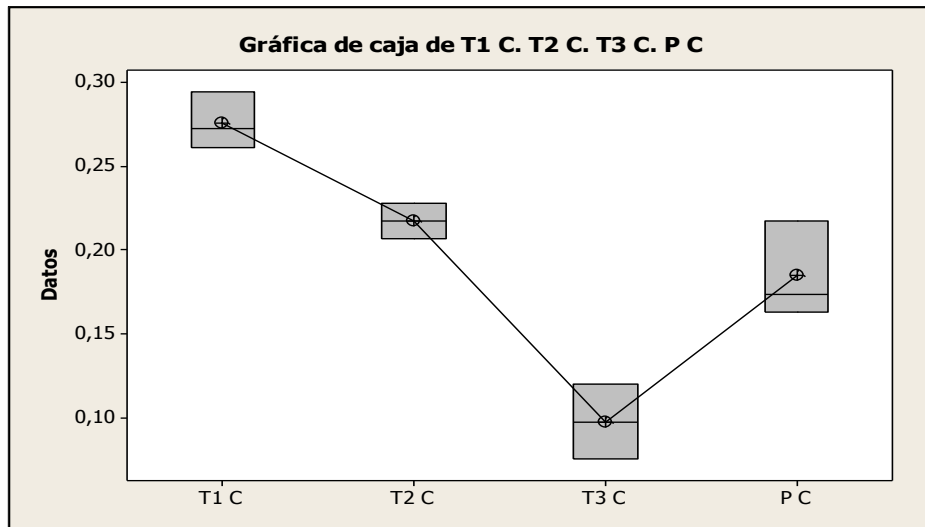


Ilustración 46. Actividad enzimática Catalasa, 2014.

Fuente los autores.

GRAFICO SIMULTANEO ACTIVIDAD ENZIMÁTICA UREASA Y CATALASA.

A continuación se presenta el cuadro comparativo entre la actividad enzimática, tanto de la Ureasa como de la Catalasa.

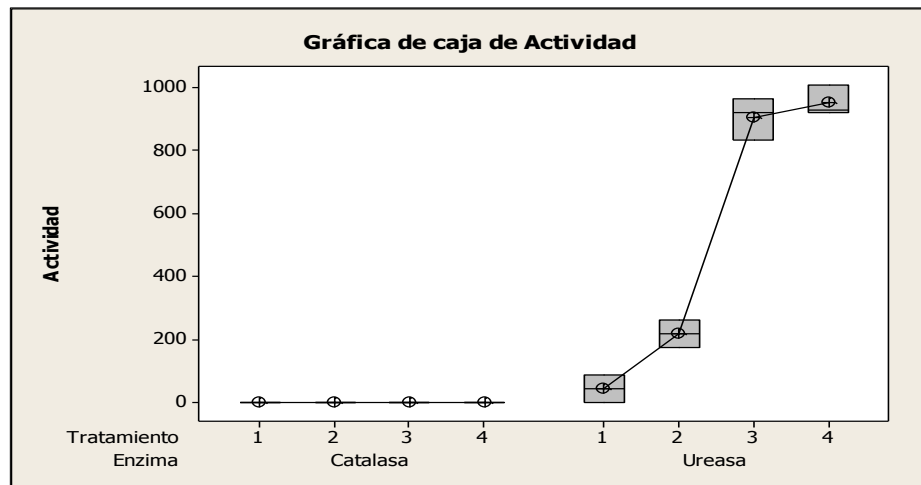


Ilustración 47. Actividad enzimática Catalasa y Ureasa, 2014.

Fuente los autores.

El análisis enzimático en cada uno de los tratamientos nos ayudara a corroborar las hipótesis planteadas, y como se puede observar existen diferencias entre cada uno de los tratamientos en cuanto a la actividad enzimática, esta diferencia al igual que en el análisis de las semillas tendrá que ser comprobada estadísticamente.

2. DISCUSIÓN.

Los resultados obtenidos del estudio realizado en los bioensayos con semillas, muestra que el T2, fue el tratamiento que obtuvo los valores más elevados en la mayoría de los parámetros medidos tanto por semilla como por factor de germinación. Tan solo fue inferior en 2 factores (Radícula – Trigo y Biomasa – maíz) donde el testigo prueba y el T1 resultó con el valor más alto respectivamente.

Sin embargo esta diferencia numérica existente con el T2 no pudo ser reflejada estadísticamente en donde se muestra que no es significativa.

En el caso de las Enzimas para la **UREASA**, si se pudo demostrar estadísticamente la diferencia existente entre tratamientos, dando como resultado que el T3 fue el que presento una mayor actividad enzimática en comparación con los otros tratamientos e incluso llegando a casi igualar la actividad enzimática encontrada en el suelo prueba (sin contaminación)

Para el caso de la **CATALASA**, existieron 2 tratamientos (T1 y T2) que superaron la actividad enzimática del suelo prueba (sin contaminación) por lo que se puede decir que fueron los mejores. Estadísticamente también se pudo demostrar que la diferencia existente entre el T1 con el T3 es significativa, no así con la diferencia entre el T2 y T3. Sin embargo se debe anotar que ninguno de los 3 tratamientos tuvo una diferencia significativa con el valor del suelo prueba. De esta manera tomamos como mejor tratamiento el T1.

Esto no quiere decir que el proceso de biorremediación no se completó exitosamente, al contrario, se pudo apreciar que los 3 tratamientos empleados para la biorremediación del suelo contaminado con hidrocarburos develaron buenos resultados tanto en la actividad enzimática como en la germinación de semillas.

3. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

ANÁLISIS SEMILLA.- FACTOR DE GERMINACIÓN.

LONGITUD DE LA RADÍCULA EN SEMILLAS DE MAÍZ *Zea mays*.

En lo correspondiente a longitud de la radícula en semillas de maíz *Zea mays* estadísticamente no existe una diferencia significativa, por lo que podríamos afirmar que la concentración de HAPs presentes en el suelo no afecta el proceso de germinación.

LONGITUD DE LA RADÍCULA EN SEMILLAS DE TRIGO *Triticum aestivum*.

La concentración de Hidrocarburos aromáticos policíclicos presente en el suelo, luego de un proceso de biorremediación, de hidrocarburos aromáticos policíclicos HAPs, no afecta al proceso normal de germinación de semillas de trigo *Triticum aestivum*.

LONGITUD DE LA RADÍCULA EN SEMILLAS DE LECHUGA *Lactuca Sativa*.

Luego del análisis se puede evidenciar que la concentración de Hidrocarburos aromáticos policíclicos HAPs, presente en el suelo, luego de un proceso de biorremediación, de alguna manera afecta al proceso normal de germinación de semillas de lechuga *Lactuca Sativa L.*

FACTOR DE GERMINACIÓN.

LONGITUD DEL HIPOCÓTILO EN SEMILLAS DE MAÍZ *Zea mays*.

En base al análisis estadístico podemos concluir que la concentración de Hidrocarburos aromáticos policíclicos HAPS, presente en el suelo, luego de un proceso de biorremediación, no afecta al proceso normal de germinación de la semilla de maíz *Zea mays*.

LONGITUD HIPOCÓTILO EN SEMILLAS DE TRIGO *Triticum aestivum*.

Cabe señalar que para el caso de las semillas de trigo, existe desarrollo del sistema radicular, y una malformación en el desarrollo del hipocótilo, en cuatro repeticiones. Podemos establecer una relación con la presencia de HAPs (concentración) y el desarrollo del hipocótilo.

LONGITUD DEL HIPOCÓTILO EN SEMILLAS DE LECHUGA *Lactuca sativa*.

En este análisis al igual que en el caso de las semillas de trigo, *Triticum aestivum* existe desarrollo del sistema radicular, aunque el desarrollo del hipocótilo es casi nulo y con malformaciones en cuatro repeticiones.

BIOMASA EN SEMILLAS DE MAÍZ *Zea mays*.

De acuerdo al análisis estadístico, la concentración de Hidrocarburos aromáticos policíclicos HAPs, presente en el suelo luego del proceso de biorremediación, no afecta al proceso normal de germinación de las semillas de maíz. *Zea mays*, considerando la no diferencia estadística entre el testigo y tratamiento.

BIOMASA EN SEMILLAS DE TRIGO *Triticum aestivum*.

Luego del análisis estadístico se establece la siguiente conclusión: la concentración de Hidrocarburos aromáticos policíclicos HAPs, presente en el suelo luego de un proceso de biorremediación, no afecta al proceso normal de germinación de la semillas de trigo *Triticum aestivum*.

BIOMASA EN SEMILLAS DE LECHUGA *Lactuca sativa*.

En lo referente al tratamiento 1 con el testigo, no existe diferencia estadística, siendo la diferencia con el tratamiento 2, aunque esta diferencia no es altamente significativa.

ANÁLISIS ENZIMÁTICO.

En el análisis de la enzimas, tanto Ureasa como la Catalasa, se realizó tomando en cuenta a cada una de ellas y los tratamientos realizados.

El análisis enzimático en cada uno de los tratamientos nos ayudara a corroborar las hipótesis planteadas, y como se puede observar existen diferencias entre cada uno de los tratamientos en cuanto a la actividad enzimática, esta diferencia al igual que en el análisis de las semillas tendrá que ser comprobada estadísticamente.

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.

UREASA.

En base al análisis estadístico podemos concluir que existe una diferencia significativa entre todos los tratamientos excepto el caso del tratamiento 3 con el testigo.

Por lo tanto, la concentración de Hidrocarburos aromáticos policíclicos HAPs presente en el suelo, luego del proceso de biorremediación, afecta a la actividad enzimática de la

ureasa, con excepción del tratamiento 3 (Consortio microbiano formado por hongos del género *Trichoderma*).

CATALASA.

En base a los resultados del análisis estadístico, se concluye que, **La concentración de Hidrocarburos presente en el suelo, luego de un proceso de biorremediación, afecta a la actividad enzimática de la catalasa.**

Igualmente se concluye que el tratamiento 1 tiene una diferencia significativa con todos los tratamientos presentándose claramente como el mejor.

CONCLUSIÓN GENERAL.

Los resultados obtenidos del estudio realizado en bioensayos con semillas, demuestra que los tratamientos (consorcios microbianos formados por hongos del género *Trichoderma*) influyen en el desarrollo de los factores a medir (radícula, hipocótilo, biomasa) y que la concentración de HAPs presente en el suelo luego del proceso de biorremediación no afecta el desarrollo de las semillas de vegetales en análisis

El proceso de germinación se produce de manera normal, excepto en el análisis de la longitud del hipocótilo en semillas de trigo *Triticum aestivum* y lechuga *Lactuca sativa* L. A pesar de que el sistema radicular se presenta en dichas semillas no se pudo completar exitosamente, dando un valor mínimo en el hipocótilo.

Desde el punto de vista del análisis enzimático, los mejores tratamientos, son el T3 para Ureasa y el T1 para Catalasa. En el presente estudio no se pudo comprobar que exista una relación entre la germinación de las semillas y la actividad enzimática del suelo, los análisis se hicieron por separado.

Según el RAOH (Reglamento Alternativo de Operaciones Hidrocarburíferas) los valores máximos de Hidrocarburo Aromáticos Policíclicos (HAPs) permitidos en el suelo para los diferentes usos son los siguientes:

Parámetro	Expresado en	Unidad	Uso agrícola	Uso industrial	Ecosistemas sensibles
Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs)	C	mg/Kg	< 2	< 5	< 1

Tabla 16. Resumen del RAOH, valores máximos permitidos de HAPs en el suelo, 2013.

Fuente: Reglamento Alternativo de Operaciones Hidrocarburíferas (RAOH).

Además no existen los parámetros para la identificación de las enzimas, por lo que no se puede hacer una comparación con los resultados obtenidos.

RECOMENDACIONES.

- Se recomienda el uso de los microorganismos utilizados en el proceso de biorremediación de HAPs por los antecedentes antes mencionados, igualmente se recomienda seguir esta línea de investigación y completar el análisis enzimático de la deshidrogenasa y lipasa, como enzimas indicadoras de la calidad del suelo.
- Incentivar a los estudiantes en el desarrollo de nuevas temáticas, que se constituyan en un avance para la carrera de Ingeniería Ambiental.
- Se recomienda el uso de consorcios microbianos formados por hongos biorremediadores.

BIBLIOGRAFÍA.

- ADAMS, M. (1995). *Fundamentos de química de suelos*. Caracas, Venezuela.
- Advanced Biotech. (2000). *Advanced Biotech*.
- ALEF, K y NANNIPIERI, P. (1998). *Enzyme activities: Catalase activity*. Gran Bretaña.
- BARAJAS-ACEVES, M. (2008). *Ensayos de metabolismo microbiano en suelo: Actividad deshidrogenasa y tasa de mineralización de nitrógeno*. (Ramírez-Romero, Ed.)
- BECERRA, Karla; *et al.* (2010). Peroxidasas de soya y chayote para la remoción de colorantes textiles de aguas artificialmente contaminadas. *Memorias congreso ANCAS 2012*, 77.
- BURNS, R. (1982). *Enzyme activity in soil*.
- CANTU, A. (2007). *Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo*. México.
- CASANOVA, E. (2005). *Introducción a la ciencia del suelo* (2da ed.). Caracas, Venezuela.
- CERON, R.L y MELGAREJO, M.L. (2005). *Enzimas del suelo: ndicadores de calidad y salud*. Colombia .
- CHINEAU, H; *et al.* (2003). *Bioremediation of crude oil-polluted soil*.
- CONTRERAS, Diana; *et al.* (2011). Eliminación de PB (II) empleando *Escherichia Coli*. *Memorias congreso ANCA 2012*, 83.
- CORONA, Liliana e ITURBE Rosario. (Junio de 2005). Atenuación natural en suelos contaminados con hidrocarburos. *Ingeniería. Investigación y Tecnología*, 3.
- CRAIG, James; *et al.* (2012). *Recursos de la tierra y el medio ambiente*. Madrid, España: Pearson.
- CURTOSI, Antonio; *et al.* (2003). "Estudio preliminar sobre la concentración de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) en suelo y sedimento, en los alrededores de la base científica Argentina Jubany.". *Base científica Argentina Jubany.*, 1.
- DE LA ROSA, D. (2008). *Evaluación Agro-ecológica de suelos para un desarrollo rural sostenible*. Madrid, España.

- DÉLEY, Á. (2010). *Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo del campamento de Sacha 161 utilizando el hongo pleurotus ostreatus*. Riobamba, Ecuador.
- DI PAOLA, María y VICIÉN, Carmen. (2010). Biorremediación: vinculaciones entre investigación, desarrollo y legislación. 33.
- DÍAZ, Gilberto; *et al.* (1994). Contaminación por hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP'S) disueltos en la laguna Mecoacan, Tabasco, México. *Hidrobiologica*, 22.
- DORAN, J.W; *et al.* (2002). *Soil health and global sustainability, translating science into practice. Agriculture Ecosystems and Enviroment*.
- DORN, P; *et al.* (1998). *Assessment of the acute toxicity of crude oils in soils using earthworms, microtox, and plants*.
- EIBES, G; *et al.* (2006). *Enzymatic degradation of anthracene, dibenzothiophene and pyrene by manganese peroxidase in media containing acetone*.
- FAO. (2005). *FAO.org*. Recuperado el Noviembre de 2013, de ftp://ftp.fao.org/fi/CDrom/FAO_Training/FAO_Training/General/x6706s/x6706s08.htm#top
- FAO. (2006). Base referencia mundial del recurso suelo. *Informes sobre Recursos Mundiales de Suelos*, 117.
- FAO-Unesco. (1990). Mapa mundial de Suelos. *Informes sobre Recursos Mundiales de Suelos*.
- FASSBENDER, H. (1975). *Química de los suelos, con énfasis en suelos de America Latina*. (M. d. Cruz, Ed.) Turrialba, Costa Rica: IICA.
- FERNÁNDEZ, Adrián; *et al.* (1995). *Las sustancias tóxicas persistentes*. México: INE.
- FERNÁNDEZ, Luis; *et al.* (2006). "Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados". *Instituto Mexicano del Petróleo*, 89.
- FERRERA, Ronald; *et al.* (2006). Procesos de biorremediacion de suelo y agua contaminados por hidrocarburos del petróleo y otros compuestos orgánicos. *Microbiologia Alam*.
- G, Adam y H, Duncan. (2002). *Influence of diesel fuel on seed germination*.
- GARCÍA, C; *et al.* (2003). *Técnicas de análisis de parámetros bioquímicos en suelos*. España: Mundi-Prensa.

- GARCÍA, Inés y DORRONSORO, Carlos. (2001). Contaminación del suelo. 20.
- GARCÍA, O; *et al.* (2012). Biodegradación de un crudo mediano en suelos de diferente textura con y sin agente estructurante. *Bioagro*, 102.
- GARCÍA, R; *et al.* (2008). *Suitability of enzyme activities for the monitoring of soil quality improvement in organic agricultural systems.*
- GIANFREDA, L y RUGGIERO, P. (2006). *Enzyme activities in soil.* (P. S. Nannipieri, Ed.) Alemania.
- GISBERT, Juan; *et al.* (2006). *Horizontes de diagnóstico del suelo.* Universidad Politecnica de Valencia , Valencia.
- HERNÁNDEZ, Alberto; *et al.* (2006). *El suelo: Fundamentos sobre su formación, los cambios globales y su manejo* (1ra ed.). Nayarit, México.
- HUDSON, N. (2006). *Conservación del suelo.* Barcelona, España: Reverté.
- INFANTE, Carmen y MORALES, Fernando. (2012). *Evaluación de la toxicidad en desechos y suelos petrolizados empleados semillas de Lactuca sativa L.*
- JÍMENEZ, B. (2001). *La contaminación ambiental en México.* México: Limusa.
- JORDÁN, A. (2006). *Manual de Edafología.* Sevilla, España.
- LABUD, V; *et al.* (2007). *Effect of hydrocarbon pollution on the microbial properties of a sandy and clay soil.*
- MARGESIN, R; *et al.* (2000). *The impact of hydrocarbon remediation (diesel oil and polycyclic aromatic hydrocarbons) on enzyme activities and microbial properties of soil.*
- MARTÍN, Carmen; *et al.* (2004). Tratamientos biológicos de suelos contaminados: Contaminación por hidrocarburos. Aplicaciones de hongos en tratamientos de biorecuperación. *Revisión*, 104.
- MARTÍNEZ, Víctor y LÓPEZ, Felipe. (2001). Efecto de hidrocarburos en las propiedades físicas y químicas de suelo arcilloso. *Terra Latinoamericana.*
- MCBRIDE. (1994). *Environmental Chemistry of Soils.* Inglaterra.
- MONTEJO, Marisol; *et al.* (2009). Técnicas para el análisis de actividad enzimática en suelos. *Métodos ecotoxicológicos para la evaluación de suelos contaminados con hidrocarburos*, 20.

- MONTT, P. (2006). *Araucaria*. Recuperado el Noviembre de 2013, de <http://araucarias.blogspot.com/>
- MOORE, R. (1985). *Handbook on Tetrazolium Testing*.
- MORENO, Héctor; *et al.* (2011). *Clasificación de Suelos de acuerdo a su taxonomía*. Valencia, España: Repositorio Institucional de la Universidad Politécnica de Valencia RiuNet.
- MUÑOZ-AMADOR, Omar; *et al.* (2001). Partículas suspendidas, hidrocarburos aromáticos policíclicos y mutagenicidad en el suroeste de la ciudad de México. *Contaminación ambiental*, 201.
- NAVARRO, Simón y GARCÍA, Ginés . (2003). *Química agrícola* (2da ed.). (Mundi-Prensa, Ed.) Madrid, España: Aedos, s.a.
- NAVARRO, Simon y NAVARRO Gines. (2003). *Química Agrícola*. Madrid: Mundi-Prensa.
- OMI. (2005). *Manual sobre la contaminación ocasionada por hidrocarburos* (2da ed.). Londres.
- QUINTERO, R; *et al.* (2005). *Manual para la medición de actividades enzimáticas en compost y vermicompost*. México.
- REYES, Genaro; *et al.* (2005). *Introducción a la agroquímica* (2da ed.). Puebla, México.
- REYES, Hernández; *et al.* (2012). Caracterización de bacterias aisladas de un suelo altamente impactado con petróleo crudo. *Memorias congreso ANCA 2012*, 79.
- ROSALDO, J. EVALUACIÓN DE LA DETOXIFICACIÓN DE UN SUELO CONTAMINADO CON HIDROCARBUROS MEDIANTE PLANTAS INDICADORAS. *EVALUACIÓN DE LA DETOXIFICACIÓN DE UN SUELO CONTAMINADO CON HIDROCARBUROS MEDIANTE PLANTAS INDICADORAS*. Universidad Veracruzana, Veracruz.
- RUDA, Ester; *et al.* (2004). *Contaminación y salud del suelo*. Santa Fe, Argentina: UNL.
- RUSSELL E.J y WILD Alan. (1988). *Condiciones del suelo y desarrollo de las plantas segun Russell*. Londres.

- SÁNCHEZ, Pedro; *et al.* (1981). *Suelos del trópico características y manejo*. San José, Costa Rica: IICA.
- SCHINNER, F; *et al.* (1993). *The influence of herbicides on microbial activity in soil materials*.
- SCHMIDT, P. (1985). *Fuel Oil Manual*. New York.
- Science in School*. (2008). Recuperado el Noviembre de 2013, de <http://www.scienceinschool.org/print/1074>
- SEBITO. (2004). *Biotecnología y medio ambiente, preguntas y respuestas*.
- STOCKING, Michael y MURNAGHAN, Niamh. (2001). *Manual para la evaluación de campo de la degradación de la tierra*. Madrid.
- THIEMAN, William y PALLADINO Michael. (2010). *Introducción a la biotecnología*. Pearson.
- THOMPSON, L.M y TROEH, F.R. (1988). *Los suelos y su fertilidad* (4ta ed.). New York, USA: Reverté.
- UACH. (Febrero de 2009). *Catalasa. Práctica No.1. Laboratorio*. Recuperado el Noviembre de 2013, de <http://es.scribd.com/doc/20709625/practica-CATALASA>
- USEPA. (1999). (*U.S. Enviromental Protection Agency*).
- USÓN, Asunción; *et al.* (2010). *Tecnología de suelos: estudio de casos*. Zaragoza, España.

GLOSARIO DE TÉRMINOS.

- **AMBIENTE:** Es el conjunto de elementos bióticos y abióticos que interactúan en un espacio y tiempo determinados.
- **BIOENSAYO:** Utilización de organismos vivos para medir el efecto de una sustancia, factor o condición, comparando la situación antes y después del experimento.
- **BIODEGRADACIÓN:** Es el resultado de procesos de digestión, asimilación y metabolización de un compuesto orgánico, llevado a cabo por bacterias, hongos protozoos y demás organismos degradadores.
- **BIODEGRADABLE:** Propiedad de toda materia de origen orgánico de poder ser metabolizada por medios biológicos.
- **BIODISPONIBILIDAD:** Fracción de un nutriente que está disponible para para un organismo; es decir el porcentaje que un organismo consume, puede asimilar y utilizar en sus funciones biológicas normales.
- **BIOMASA:** Cantidad de materia orgánica presente en un ecosistema.
- **BUNKER (Fuel Oil # 6):** Combustible que se obtiene de la destilación del petróleo crudo, de color negro, utilizado en calderas para la generación de energía eléctrica.
- **CACIÓN:** Ion de carga positiva.
- **cc:** Centímetros cúbicos, (equivalencia a ml).
- **COLOIDE:** Es un sistema formado por dos o más fases, una fluida o líquida y otra dispersa o sólida.
- **CONSISTENCIA:** Resistencia de un material a la deformación o ruptura.
- **CO:** Monóxido de carbono. Gas tóxico
- **CO₂:** Anhídrido carbónico. Gas tóxico.
- **COMBUSTIBLES:** Mezclas de Hidrocarburos utilizados para generar energía por medio de combustión que cumplen con las normas NTP para dicho uso o normas internacionales en lo no previsto por aquellas.

- **CRUDO:** Mezcla homogénea de compuestos orgánicos, principalmente hidrocarburos insolubles en agua, que se produce al interior de la tierra por transformación de materia orgánica acumulada.
- **CONTAMINANTE:** Material, sustancia o energía que al incorporarse o actuar sobre el ambiente, degradan su calidad original a niveles no propios para la salud y el bienestar humano, poniendo en peligro los ecosistemas naturales.
- **DENSIDAD APARENTE DEL SUELO:** Masa de suelo seco por unidad de volumen aparente; el volumen aparente se determina antes de secar a peso constante a 105°C.
- **DETRITO:** Material suelto o sedimento.
- **DERRAME DE HIDROCARBUROS:** Escape o pérdida del hidrocarburo, atribuido a operaciones imprevistas o por causas naturales que desembocan en el suelo o un cuerpo de agua.
- **EDÁFICO:** Perteneciente al suelo o relativo a él.
- **EDAFOGÉNESIS:** Proceso de formación y evolución de un suelo.
- **EROSIÓN:** Desgaste de la superficie del suelo por agua corriente, viento, hielo u otros agentes geológicos incluyendo procesos como deslizamiento gravitacional.
- **ESTRUCTURA DEL SUELO:** Combinación o arreglo de las partículas de suelos.
- **ENZIMA:** Molécula de naturaleza proteica, que cataliza reacciones químicas para que ocurran con mayor rapidez.
- **EVAPOTRANSPIRACIÓN:** Pérdida combinada de agua de una superficie dada y en un tiempo determinado, por evaporación del suelo y transpiración de las plantas.
- **g.:** Gramos.
- **HIDRÓFODO:** No afín al agua o repelido por el agua.
- **HIPOCÓLITO:** Es el termino botánico usado para referirse a una parte de la planta que germina de una semilla.
- **HORIZONTE DEL SUELO:** Capa de suelo aproximadamente paralela a la superficie del terreno y que difiere de las capas adyacentes, genéticamente relacionadas con ella en propiedades físicas, químicas y biológicas, además de

características como color, estructura, textura, tipo y número de organismos presentes, grado de acidez o alcalinidad, etc.

- HUMUS: Fracción más o menos estable de materia orgánica del suelo que queda después de haberse descompuesto la mayor parte de los residuos animales y vegetales aportados al suelo; es de color oscuro.
- HAPs: Son un grupo de sustancias químicas que se forman durante la incineración incompleta del carbón, el petróleo, el gas, la madera, la basura y otras sustancias orgánicas, como el tabaco y la carne asada al carbón.
- IMPACTO AMBIENTAL: Es el efecto que las acciones del hombre o de la naturaleza causan en el ambiente natural y social. Pueden ser positivos o negativos.
- INFILTRACIÓN: Penetración del agua al interior del suelo.
- INTEMPERIZADO: Todos los cambios físicos y químicos producidos en las rocas, en o cerca de la superficie de la tierra por agentes atmosféricos.
- LIXIVIACIÓN: Eliminación de materiales del suelo en solución.
- M: Molaridad de la solución
- PERMAFROST: Horizonte del suelo que permanece congelado.
- PERMEABILIDAD: Capacidad de una Roca para dejarse atravesar por un fluido
- PETROLEO: Mezcla de Hidrocarburos que se encuentran en estado líquido a las condiciones iniciales de presión y temperatura del Reservorio y que mayormente se mantiene en estado líquido a condiciones atmosféricas. No incluye condensados, líquidos del Gas Natural o Gas Natural Licuado.
- PETROLEO CRUDO: Mezcla de Hidrocarburos que tiene un punto de inflamación menor 65,6°C y que no ha sido procesado en Refinerías.
- RADÍCULA: Parte del embrión de una planta que al desarrollarse constituye la raíz.
- REMEDIACIÓN AMBIENTAL: Conjunto de acciones y técnicas con el objetivo de restaurar condiciones ambientales originales o mejoradas, en sitios que han sido afectados o degradados por algún tipo de contaminación; sinónimos rehabilitación ambiental, reparación ambiental, restauración ambiental.
- SALINIZACIÓN: Proceso por el cual se acumulan sales solubles.

- **SUELO PLÁSTICO:** Cuando un suelo puede ser moldeado o deformado continua o permanentemente en varias formas, con presión relativamente moderada.
- **TOXICIDAD:** Capacidad de cualquier sustancia química de producir efectos perjudiciales sobre un ser vivo, al entrar en contacto con él.
- **TUNDRA:** Planicie ondulada o plana, sin árboles, característica de las regiones árticas.
- **ÚDICO:** Régimen de humedad del suelo en el cual el terreno no está seco durante 90 días acumulativos ni por 60 días consecutivos, cuando la temperatura del suelo a 50cm es mayor a 5°C.
- **VOC's:** Compuestos orgánicos volátiles, tienen la capacidad de formar oxidantes fotoquímicos por reacciones con los óxidos de nitrógeno en presencia de luz solar.

ANEXOS

Anexo A. FORMULA PERMEABILIDAD.

$$k = Q / IA$$

Ecuación 1. Coeficiente de permeabilidad, 2009.

Fuente ftp://ftp.fao.org/fi/CDrom/FAO_Training/FAO_Training/General/x6706s/x6706s09.htm

Dónde:

k: coeficiente de permeabilidad o conductividad hidráulica [m/s]

Q: caudal [m³/s]

I: gradiente [m/m]

A: sección [m²]

Anexo B. FORMULA DE LA POROSIDAD.

$$P = Ve/V$$

Ecuación 2. Porosidad del suelo, 2009.

Fuente ftp://ftp.fao.org/fi/CDrom/FAO_Training/FAO_Training/General/x6706s/x6706s09.htm

Dónde:

P = porosidad

Ve = volumen de espacios vacíos, comprendiendo los que están ocupados por gases o líquidos;

V = volumen total de la muestra, comprendiendo sólidos, líquidos y gases.

La porosidad expresada en porcentaje, con la fórmula:

$$P = \left(S - \frac{Sa}{S} \right) * 100$$

Ecuación 3. Porosidad expresada en porcentaje, 2009.

Fuente ftp://ftp.fao.org/fi/CDrom/FAO_Training/FAO_Training/General/x6706s/x6706s09.htm

Dónde:

P = porosidad en porcentaje del volumen total de la muestra;

S = densidad real del suelo.

Sa = densidad aparente del suelo

Anexo C. Clasificación de los suelos.

TIPO DE SUELO.		CARACTERÍSTICAS.	
AZONALES. Inmaduros o brutos, con horizontes mal desarrollados.	LITOSUELOS.	Delgados. Influidos por el tipo de roca madre debido a poca evolución temporal o desarrollo en grandes pendientes.	
	REGOSOLES.	Sobre depósitos muy recientes: aluviones, arenas, dunas.	
INTERZONALES. Poco evolucionados. Condicionados por roca madre y mal drenaje.	RANKER.	Sobre rocas silíceas (granitos, gneises). Propio de climas fríos de montaña y fuerte pendiente. Suelo ácido pobre en carbonatos. Sin horizonte B	
	RENDISINA.	Sobre rocas calizas en climas diversos. Poco espesor. Sin horizonte B. Es el equivalente al anterior en terrenos calcáreos.	
	SALINOS.	Ricos en sales. Climas secos. Escasa vegetación (halófitas). Pobre en humus.	
	GLEY.	Zonas pantanosas. Horizontes inferiores encharcados en los que se acumula Fe que le da color "gris azulado"	
	TURBERAS.	Terreno encharcado con abundante vegetación y exceso de materia orgánica. Suelo ácido.	
ZONALES. Suelos condicionados por el clima, que ha actuado largo tiempo. Son suelos maduros, muy evolucionados.	Alta lat.	TUNDRA Vegetación escasa. Evolución lenta limitada al período estival.	
	Latitudes medias	Clima frío	PODSOL Tierras grises o de cenizas. Asociados a bosques de coníferas (taiga). Rico en humus bruto. Suelo ácido y arenoso
		TIERRA PARDA DE BOSQUE En bosques de caducifolios. Rico en humus. Horizonte B poco desarrollado.	
	Climas templados	MEDITERRÁNEOS Veranos secos. Asociados a bosques de encinas y arbustos. Pobres en humus y arcillosos por descalcificación de calizas. Destacan los suelos rojos mediterráneos o terra rossa.	
		CHERNOZIOM Tierras negras de estepa. Climas continentales. Horizonte A muy desarrollado y rico en humus y óxidos de Fe. Suelos muy fértiles.	
		DESÉRTICOS Poca materia orgánica, por lo que tienen un color claro. Presentan concreciones de carbonatos precipitados a partir de aguas capilares o caliches.	
	Latitud intertropical	LATERITAS Clima ecuatorial, cálido y muy lluvioso. Intensa meteorización química: suelos de gran espesor. Carecen de horizonte A por el lavado intenso. El horizonte B presenta hidróxidos de Fe y Al. Se forma una costra rojiza muy dura.	

Tabla 17. Tipos de suelo, 2010.

Fuente <http://platea.pntic.mec.es/~cmarti3/CTMA/SUELO/clasif1.htm>

Anexo D. MATERIALES, REACTIVOS Y SOLUCIONES UTILIZADOS EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA UREASA.

Materiales utilizados.

Bureta de 100cc.	Estufa.
Matraces Volumétricos 50, 100 y 1000cc.	Balanza Analítica.
Vasos de precipitación 50, 250 y 600cc.	Papel aluminio.
Pipeta volumétrica de 10cc.	Estufa de incubación.
Soporte universal.	Equipo titulación.
Equipo de destilación.	

Tabla 18. Materiales utilizados en la práctica de la Ureasa, 2013.

Fuente los autores.

Reactivos.

Ácido bórico (H_3BO_4).	Hidróxido de sodio (NaOH).
Ácido sulfúrico (H_2SO_4).	Indicador de rojo de metilo.
Agua destilada.	Indicador de verde de bromocresol.
Amortiguador TRIS (hidroxi metil aminometano).	Oxido de magnesio (MgO).
Cloruro de potasio (KCl).	Sulfato de plata (Ag_2SO_4).
Etanol.	Sulfato de amonio (NH_4SO_4).
Tolueno.	Urea.

Tabla 19. Reactivos utilizados en la práctica de la Ureasa, 2013.

Fuente los autores.

Soluciones.

- Solución de ácido sulfúrico 0.005 M. Disolver 0.2cc de ácido sulfúrico al 98% en un matraz aforado que contenga 500cc de agua destilada y aforar a 1000cc.
- Solución de amortiguador TRIS 50 M pH 9. Disolver 6.1g de TRIS en 700cc de agua destilada, ajustar el pH a 9.0 con H_2SO_4 (0.2 M) y aforar con agua destilada a 1000cc.

- Solución de cloruro de potasio 2.5 M y sulfato de plata. Disolver 100mg de Ag_2SO_4 y 188g de KCl en 700cc de agua destilada y aforar a 1000cc con agua destilada.
- Solución indicadora de ácido bórico. Disolver 0.066g de verde de bromocresol y 0.033g de rojo de metilo en etanol (95%) y aforar a 100cc. Tomar 10cc de la solución indicadora y agregarlos en un matraz volumétrico de 500cc. Mezclar 10g de H_3BO_4 con 350cc de agua destilada caliente hasta disolver perfectamente. Después, enfriar y añadir la solución al matraz. Agregar gota a gota la solución de NaOH 0.05 M hasta observar un vire de color rosa a verde ligero. Finalmente, aforar con agua destilada.
- Solución estándar de amonio. Disolver 0.234g de NH_4SO_4 en agua destilada y diluir en 1000cc. La concentración final de N- NH_4 en esta solución es de 50 $\mu\text{g}/\text{cc}$.
- Solución de hidróxido de sodio 0.05 M. Colocar 0.2g de NaOH y adicionar 500cc de agua destilada agitando lentamente y aforar a 1000cc.
- Solución de óxido de magnesio. Calentar 1g de MgO por muestra de suelo a analizar a 600-700°C en mufla durante 2h. Esperar a que disminuya la temperatura en la mufla y guardar en un desecador.
- Solución de urea 0.2 M. Disolver 0.12g de urea en 8cc de amortiguador TRIS y aforar a 10cc. Es necesario preparar la solución diariamente y guardar a 4°C.

Anexo E. Materiales, Reactivos y Soluciones utilizados en la Actividad enzimática de la Catalasa.

Materiales utilizados.

Agitador magnético.	Soporte universal.
Estufa.	Bureta de 100cc.
Matraz de 1000cc.	Frasco ámbar.
Equipo de titulación.	Tamiz Mesh 0.5mm
Vasos de precipitación 50, 250 y 600cc.	Pipeta graduada.
Balanza Analítica.	

Tabla 20. Materiales utilizados en la práctica de la Catalasa, 2013.

Fuente los autores.

Reactivos.

Ácido sulfúrico (H_2SO_4).
Agua destilada.
Permanganato de potasio ($KMnO_4$).
Peróxido de hidrogeno (H_2O_2).
Oxalato de sodio.

Tabla 21. Reactivos utilizados en la práctica de la Catalasa, 2013.

Fuente los autores.

Soluciones.

- Solución de ácido sulfúrico 1.5 M. Se depositan 82.6cc de H_2SO_4 de 98% en matraz aforado y se lleva a 1000cc.
- Solución de permanganato de potasio 0.01 M. Se pesan 1.5804g de $KMnO_4$, se depositan en un matraz Erlenmeyer. Se adicionan 400cc de agua destilada, agitando con agitador magnético y calentando hasta su disolución completa. Se deja enfriar, se filtra y se afora a 1000cc utilizando un matraz aforado. Se guarda en frasco ámbar; la solución se debe valorar cada vez que se utilice con oxalato de sodio para conocer su normalidad.

- Solución de peróxido de hidrogeno 1:100. Se toma una alícuota de 1cc de H₂O₂ (agua oxigenada) al 30%, se afora a 100cc. Esta solución debe prepararse inmediatamente antes de su uso.

Anexo F. Materiales, Reactivos y Soluciones utilizados en Bioensayos con semillas.

Materiales utilizados.

Buretas.	Rota vapor.
Matraces Volumétricos.	Estufa.
Matraces Aforados.	Papel filtro 4 pliegos.
Recipientes.	Cajas Petri.
Pipetas.	Semillas.
Cámara de cultivo.	Equipo Soxhlet.
Balanza analítica.	Regla graduada.
Estufa de incubación.	Papel aluminio.
Mufla.	

Tabla 22. Materiales Utilizados en la práctica de bioensayos con semillas, 2013.

Fuente los autores.

Reactivos.

Ácido bórico.	Sulfato de Amonio.
Ácido Sulfúrico.	Tolueno.
Agua destilada.	Urea.
Hidroxi metil aminometano.	Permanganato de potasio.
Cloruro de potasio.	Acetona.
Etanol.	Sulfato de sodio anhidro.
Hidróxido de sodio.	Diclorometano grado HPLC.
Indicador de rojo metilo.	Cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio.
Indicador de verde bromocresol.	Oxalato de sodio.
Óxido de magnesio.	Peróxido de hidrogeno.
Sulfato de Plata.	Hipoclorito de sodio.

Tabla 23. Reactivos utilizados en la práctica de bioensayos con semillas, 2013.

Fuente los autores.

Soluciones.

- Solución de cloruro de trifeniltetrazolio al 1%. Pesar 10g de 2,3,5-cloruro de trifeniltetrazolio y depositar en matraz aforado de 1000cc, aforando y mezclando suavemente con agua destilada. El pH debe estar entre 6 y 8.
- Solución de hipoclorito de sodio al 5%. En un matraz aforado de 500cc, adicionar 25cc de NaClO y aforar con agua destilada, agitando lentamente. Se puede utilizar blanqueador comercial, que contiene comúnmente 6% de hipoclorito.
- Solución de ácido bórico. Pesar 25g de H₃BO₃, depositar en un matraz y aforar a 1 litro con agua des ionizada.

Anexo G, CÁLCULOS UREASA.

$$A_U = \frac{V(M - C) \times 70}{S_h \times S_s}$$

Ecuación 4. Actividad de la ureasa, 2013.

Fuente: Montejo, Marisol, Torres Cinthya, Martínez Ángeles, José Tenorio, Cruz María, Ramos Fernando y Cuevas María.

A_u = actividad de la ureasa en $\frac{\mu\text{gN-NH}_4}{\text{g de suelo sexo} \times 2\text{h}}$

M = volumen de H₂SO₄ gastado en la muestra en cc.

C = volumen de H₂SO₄ gastado en el control en cc.

70 = factor de conversión en $\frac{\mu\text{gN-NH}_4}{\text{ml de H}_2\text{SO}_4}$

ss = peso en base seca de un gramo de suelo.

sh = peso de suelo utilizado en g.

V = volumen total de la suspensión en cc.

Anexo H, CÁLCULOS CATALASA.

$$Ac = \frac{[BG - (S - B)] * N * 0.5 * V * T}{Ss}$$

Ecuación 5. Actividad de la catalasa, 2013.

Fuente Montejo, Marisol, Torres Cinthya, Martínez Ángeles, José Tenorio, Cruz María, Ramos Fernando y Cuevas María.

Ac = Actividad de la catalasa en $\frac{\text{mmoles de H}_2\text{O}_2 \text{ consumidos}}{\text{g de suelo seco} * \text{h}}$

Bg = cantidad de KMnO₄ (en cc) gastados en la valoración del blanco son suelo y con H₂O₂.

S = cantidad de KMnO₄ (en cc) gastados en la valoración de las muestras.

B = cantidad de KMnO₄ (en cc) gastados en la valoración del control correspondiente a cada muestra de suelo.

N = normalidad exacta del permanganato potásico.

0.5 = valor constante que procede del cálculo para conocer los mg de H₂O₂ que reaccionan con el KMnO₄ [peso molecular de H₂O₂ (34 dividido por estado de oxidación de (2))] y del cálculo para obtener la cantidad de H₂O₂ en moles (1/peso molecular H₂O₂).

V = factor de dilución; en este caso es de 50cc /25cc.

T = factor de tiempo (6) porque son 10 minutos; se reporta hora (60/10=6).

Ss = factor relativo a la cantidad de suelo seco utilizado (aquí se toma 0.5g se suelo húmedo y se pone a secar en la balanza de humedad).

Anexo I, TRATAMIENTOS 1, 2 Y 3

TRATAMIENTO 1 (T1)	TRATAMIENTO 2 (T2)	TRATAMIENTO 3 (T3)
<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Trichoderma</i> sp.
<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Trichoderma</i> sp.

Tabla 24 Tratamientos utilizados en la experimentación, 2013.

Fuente: Manuel Ernesto Delgado Fernández, PhD